
Abteilung für Visceral- Thorax- und Gefäßchirurgie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. D.K. Bartsch

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Philipps



**Universität
Marburg**

Enalapril als Chemoprävention des duktaalen Pankreaskarzinoms im transgenen Tumormausmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nai-ming Chen
aus Kaohsiung, Taiwan
Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps–Universität Marburg am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med Mathias Rothmund

Referent: PD. Dr. med. Volker Fendrich

1.Korreferent: Prof. Dr. Med. Volker Ellenrieder

Für meine Familie und Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary	VI
1. Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.2 Molekulargenetischer Hintergrund des Pankreaskarzinoms	3
1.3 Molekulare Signalwege im Pankreaskarzinom	8
1.4 Das Angiotensin-System	12
1.5 Pankreaskarzinom im Tumormausmodell	18
1.6 Zielsetzung	20
1.7 Fragestellung	21
2.1 Materialien	22
2.2 Methoden	28
3.1. Entwicklung von PanINs und Pankreaskarzinom bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} und Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} Mäusen	41
3.2 Überexpression von AT1-Rezeptor in Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} -Mäusen und LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} ;Pdx-1-Cre-Mäusen	42
3.3 Überexpression von NF-κB in Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} -Mäusen und Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} -Mäusen	43
3.4 Wirkung von Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer Eanalapril auf die Entwicklung von PanINs in Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} -Mäusen	44
3.5 Entwicklung eines invasiven Pankreaskarzinoms von Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} -Mäusen und deren partielle Verhinderung durch Enalapril	46
3.6 Gene für VEGF und NF-κB im invasiven Pankreaskarzinom wurden durch Enalapril unterreguliert.	47
3.7 Überexpression der Amylase in PanINs und Pankreaskarzinom von Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} -Mäusen	48
7.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer	62
7.2 Danksagung	63

Zusammenfassung

In Deutschland erkrankten jährlich etwa 12.600 Menschen am dukalen Adenokarzinom des Pankreas, was 3 Prozent aller Krebserkrankungen entspricht (1). Die Gründe für die schlechte Prognose liegen in der späten Diagnosestellung und der aggressiven Tumorzellbiologie. Nur 10 bis 20 Prozent der Patienten haben bei Diagnosestellung einen resektablen Tumor; weniger als 2 Prozent überleben fünf Jahre. Beim resektablen Primärtumor beträgt die mediane Überlebenszeit 10 bis 12 Monate. Mithilfe einer adjuvanten Chemotherapie kann die Überlebenszeit auf bis zu 20 Monate verlängert werden (51). Bei acht von zehn Patienten liegt bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor; in diesen Fällen kommen nur noch palliative Maßnahmen in Betracht. Die Überlebenszeit ohne Therapie liegt bei etwa 3 bis 4 Monaten (22). Die Resultate der adjuvanten Radio- und Chemotherapie sowie der intraoperativen Bestrahlung erwiesen sich als nicht zufriedenstellend. Die Transformationsprozesse der Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Pankreaskarzinoms wurden auch festgestellt, die als sogenannte *Pancreatic Intraepithelial Neoplasias* (PanIN) bezeichnet wurde. Ein Tumormausmodell von der Arbeitsgruppe David A. Tuveson zeigte, dass die transgenen Mäuse die ähnliche Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Pankreaskarzinoms hatten, die dem humanen Pankreaskarzinom entspricht.

Bei Pdx-1-Cre;LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+-Mäusen wird die Progression von PanINs zum invasiven Pankreaskarzinom durch Chemoprävention mit Enalapril verlangsamt oder teilweise gestoppt. In der Behandlungsgruppe mit Enalapril nach 3 und 5 Monaten wird die Progression der PanINs in Pdx-1-Cre;LSL-KrasG12D/+ Mäusen signifikant verzögert ($p < 0.05$). Unsere Ergebnisse zeigten, dass mVEGF ($p < 0.05$) und mRelA ($p < 0.05$) durch Enalapril im invasiven Pankreaskarzinom signifikant runter reguliert wurden (Abb. 26). Unsere Ergebnisse bestätigten die Hemmung der Progression und der Entstehung des Pankreaskarzinoms unter Enalapril.

Summary

Pancreatic cancer is a devastating and almost uniformly lethal malignancy that accounts for approximately 12,600 deaths in Germany every year (1), 3 Percent of all cancers. The reasons for the poor prognosis are too late to diagnose and the aggressive biology of the tumor cell. At the time of diagnosis, pancreatic cancer is usually at an advanced stage and has often metastasis. Only 10 to 20 percent of patients have a resectable tumor. But less than 2 percent of patients survive five years. For patients with the resectable primary tumor is the median survival 10 to 12 months. Patients with adjuvant chemotherapy may survive up to 20 months (51). An advanced tumour stage come only palliative measures. Survival without therapy is around 3 to 4 months (22). The results of chemotherapy, adjuvant radio and Intraoperative irradiation are not satisfactory. Notably, there is now strong evidence that invasive pancreatic adenocarcinoma proceeds through a morphological spectrum of non-invasive ductal lesions known as pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN),

David A. Tuveson showed that the transgenic mice had the similar dysplasia-carcinoma sequence of pancreatic cancer, which corresponds to the human pancreatic carcinoma.

After 3 and 5 months of treatment, enalapril was able to significantly delay progression of mPanINs in LSL-Kras^{G12D}; Pdx1-Cre mice ($p < 0.05$). Furthermore, development of invasive pancreatic cancer in LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; Pdx1-Cre transgenic mice was partially inhibited by enalapril. Invasive pancreatic cancer was identified in 15 of 25 (60%) LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; Pdx1-Cre untreated control mice, but in four of 17 (23.5%, $p = 0.03$) in mice treated with enalapril. Using real-time PCR we found a significant downregulation of the target genes VEGF ($p < 0.05$) and RelA ($p < 0.05$) demonstrating our ability to achieve effective pharmacological levels of enalapril during pancreatic cancer formation in vivo. Conclusion Using a transgenic mouse model that imitates human pancreatic cancer, this study provides first evidence that enalapril are effective chemopreventive agents by delaying the progression of PanINs and partially inhibiting the formation of murine pancreatic cancer.

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

In Deutschland erkranken jährlich etwa 12.600 Menschen am dukalen Adenokarzinom des Pankreas, was 3 Prozent aller Krebserkrankungen entspricht (1). Als Todesursache nimmt das Pankreaskarzinom bei Männern die viert- und bei Frauen die fünft häufigste Tumorerkrankung weltweit ein und ist für etwa 6 Prozent aller Krebstodesfälle in Deutschland verantwortlich (13). Die Gründe für die schlechte Prognose liegen in der späten Diagnosestellung und der aggressiven Tumorzellbiologie. Bis heute gibt es keine spezifischen Untersuchungsmethoden zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms, weil das Pankreaskarzinom im Anfangsstadium häufig uncharakteristische Beschwerden verursacht und leicht mit benignen Erkrankungen verwechselt werden kann. Die Diagnosestellung erfolgt zumeist erst dann, wenn der Tumor zu einem schmerzlosen Ikterus geführt hat. 80 Prozent der Patienten klagten über unspezifische Oberbauchschmerzen mit Ausstrahlen in den Rücken und eine Gewichtabnahme. 70 Prozent der Tumore befinden sich im Bereich des Pankreaskopfes, 20 Prozent im Pankreaskorpus, und 10% im Pankreasschwanz. Nur 10 bis 20 Prozent der Patienten haben bei Diagnosestellung einen resektablen Tumor; weniger als 2 Prozent überleben fünf Jahre. Beim resektablen Primärtumor beträgt die mediane Überlebenszeit 10 bis 12 Monate. Mithilfe einer adjuvanten Chemotherapie kann die Überlebenszeit auf bis zu 20 Monate verlängert werden (51). Bei acht von zehn Patienten liegt bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor; in diesen Fällen kommen nur noch palliative Maßnahmen in Betracht. Die Überlebenszeit ohne Therapie liegt bei etwa 3 bis 4 Monaten (22). Die Resultate der adjuvanten Radio- und Chemotherapie sowie der intraoperativen Bestrahlung erwiesen sich als nicht zufriedenstellend.

Wie beim Zervix- und beim kolorektalen Karzinom wird auch beim dukalen Pankreaskarzinom ein morphologischer Transformationsprozess postuliert. Die makro- und mikroskopische Untersuchung des Transformationsprozesses von Kolonpolyphen, kolorektalen Adenomen und Karzinomen führte zur Entwicklung des Progressionsmodelles der Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms. Dieses Modell zeigt, dass die Entstehung des Kolonkarzinoms durch mehrere genetische Veränderungen bedingt ist. Innerhalb einer Veränderung des

Pankreaskarzinoms werden Transformationsprozesse duktaler Zellen klassifiziert, die als sogenannte *Pancreatic Intraepithelial Neoplasias* (PanIN) bezeichnet werden. PanINs entwickeln sich über flache Epithelhyperplasien ohne Atypien (PanIN-1A) und papilläre Hyperplasien ohne oder mit Atypien (PanIN-1B oder 2). Der weitere Transformationsprozess kann sowohl zur Entwicklung eines Carcinoma in situ (PanIN-3), als auch zum invasiven Pankreaskarzinom (PanIN-4) führen ((Abb. 1) (34, 48)).

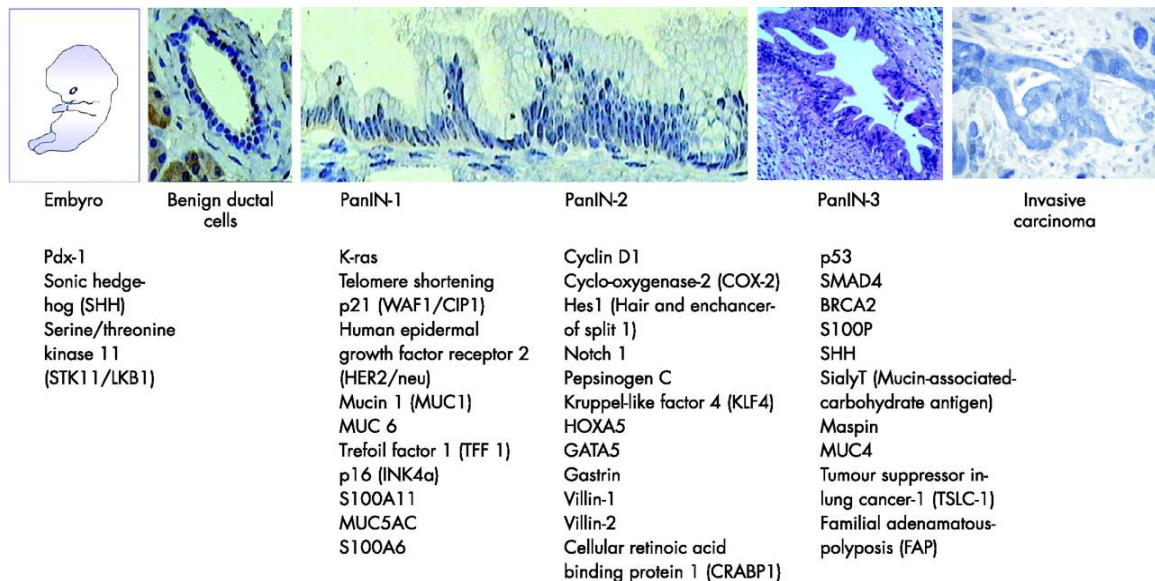


Abb1.: Histologische Bilder von pankreatischen dukталen Epithelzellen(PDA), progressiven PanIN-Läsionen und invasiven Karzinomen (mit genetischen Assoziationen) (53)

Bei resektablem Pankreaskarzinom ist die chirurgische Entfernung die Therapie der Wahl. Eine Chemotherapie sollte nach einer Operation erfolgen. Wenn die lokalen Gefäße infiltriert sind, gilt der Tumor als nicht-resektabel. Beim metastasierten Pankreaskarzinom kommt eine palliative Therapie zum Einsatz, die Gallen- und Nahrungspassage erhalten und die Lebensqualität der Patienten erhalten oder verbessern soll. Eine Heilung ist in diesen fortgeschrittenen Stadien nicht mehr möglich. Zu einer palliativen Therapie kommt eine Chemotherapie oder eine Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie in Frage. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Therapie des Pankreaskarzinoms wäre eine frühzeitige Diagnosestellung oder spezifische Untersuchungsmethoden zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms. Aufgrund der Prävalenz von Pankreaskarzinomen und dem Mangel an suffizienten diagnostischen Methoden mit hoher Sensitivität und Spezifität kann eine Routineuntersuchung zur Früherkennung nicht effizient durchgeführt werden. Ein Durchbruch zur Behandlung des Pankreaskarzinoms wäre die Möglichkeit einer Chemoprävention, besonders bei Patienten mit chronischer

Pankreatitis oder genetischer Prädisposition. Bis heute gibt es keine Studien zur Chemoprävention beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas, da bis vor einigen Jahren kein Tiermodell die Transformationsprozesse des menschlichen Pankreaskarzinoms korrekt widerspiegeln konnte.

1.2 Molekulargenetischer Hintergrund des Pankreaskarzinoms

Die ersten identifizierten molekularen Veränderungen in Tumorzellen des Pankreas betreffen die so genannten Onkogene. Das K-ras-Gen gehört zu den ersten bekannten Onkogenen und weist eine Mutationshäufigkeit von bis zu 100% auf. Es ist in bis zu 30% der frühen PanIN-Läsionen bereits nachweisbar, im duktalem invasiven Karzinom nimmt die Prävalenz auf über 90% zu. Die K-ras-Mutation wird auch gehäuft bei der chronischen Pankreatitis nachgewiesen und wird sogar in gesundem Pankreasepithel detektiert (62).

Zu den am häufigsten mutierten Genen in menschlichen Tumoren gehört das Tumorsuppressorgen p53. Eine Hauptfunktion des Tumorsuppressorgens p53 ist die Induktion eines Wachstumsstopps oder des programmierten Zelltodes nach Schädigungen der DNA, um die Ausbreitung von Mutationen zu verhindern. Der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 ist in mehr als 60% der Pankreaskarzinome inaktiviert. TP53-Mutationen treten in späteren Läsionen des Tumorprogressionsmodells (PanIN2 und PanIN3) auf. Der Verlust der p53-Funktion ist mit genomischer Instabilität assoziiert, einem Charakteristikum des Pankreaskarzinoms ((Tabelle 1)(5, 14)).

Tabelle			
Häufig veränderte Gene des Pankreaskarzinoms			
Gen	Lokus	LOH*1	Alterationsfrequenz*2
K-ras	12p12	nicht anwendbar	100% (59, 60)
p53	17p13	100% (26)	76% (59, 60)
p16 ^{INK4}	9p21	85% (9)	96% (9, 63)
DPC4	18q21.1	91% (25)	50% (25)

*1 Heterozygote Deletionen oder loss of heterozygosity (LOH) wurden mit Hilfe einer PCR-Analyse von Mikrosatelliten bestimmt. Die Prozentangaben repräsentieren diejenige Fraktion der Karzinome, die einen oder mehrere Mikrosatelliten-Marker auf dem jeweiligen chromosomalen Arm verloren hatten.

*2 Genetische Alterationen sind wie folgt angegeben: Für K-ras und p53 wurden lediglich die Sequenzveränderungen in die Berechnung eingeschlossen; für p16 und DPC4 wurden die homozygoten Deletionen und die Sequenzveränderungen aufaddiert.

Tabelle 1.: Häufig veränderte Gene des Pankreaskarzinoms(18)

1.2.1 Ras

Die aktivierenden Mutationen treten in der Regel an bestimmten Stellen des Ras-Gens auf (Kodon 12, 13 und 61). Zur Ras-Familie gehören viele wichtige G-Proteine wie K-ras, Rac, Rho und Cdc42, die eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung spielen. Ras ist an vielen verschiedenen Signalwegen beteiligt, die zur Zellproliferation führen. Mutationen, die Ras in aktivem Zustand halten, werden häufig in Tumoren nachgewiesen. G-Proteine kommen in zwei Zuständen vor, abhängig davon, ob sie GTP oder GDP gebunden haben. Die Form mit gebundenem GDP ist inaktiv und wird durch den Austausch von GDP gegen GTP in die aktive Form überführt. Diese Reaktion wird vom Guaninnucleotid Austauschfaktor (*guaninine nucleotide exchange factor*, GEF) durchgeführt. Die Form mit gebundenem GTP bleibt nicht dauerhaft aktiv, sondern wird durch eine intrinsische GTPase-Aktivität des G-Proteins schnell wieder in die inaktive Form umgewandelt. Die Reaktion wird durch GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) beschleunigt. Die GEF sind für die Aktivierung der G-Proteine zuständig und werden zum Ort der Rezeptoraktivierung in der Zellmembran gelenkt, indem sie von Adaptorproteinen gebunden werden. Die G-Proteine fungieren als molekulare Schalter und besitzen eigene spezifische GEF und GAP, die für verschiedene Signalwege verantwortlich sind (Abb. 2a). Die Aktivierung von Ras ist in der Lage, an unterschiedliche Effektoren zu binden und zu aktivieren. Vier wichtige Ras-Effektorsignalwege sind: (a) Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg (b) Ras-PIK3-Akt-Signalweg (c) Ras-Phospholipase-Signalweg (d) Ras-RalGEF. Die aktivierten Ras-Effektorsignalwege spielen eine wichtige Rolle in Genexpression, Zellzyklusprogression, Zellüberleben und Differenzierung (Abb. 2b).

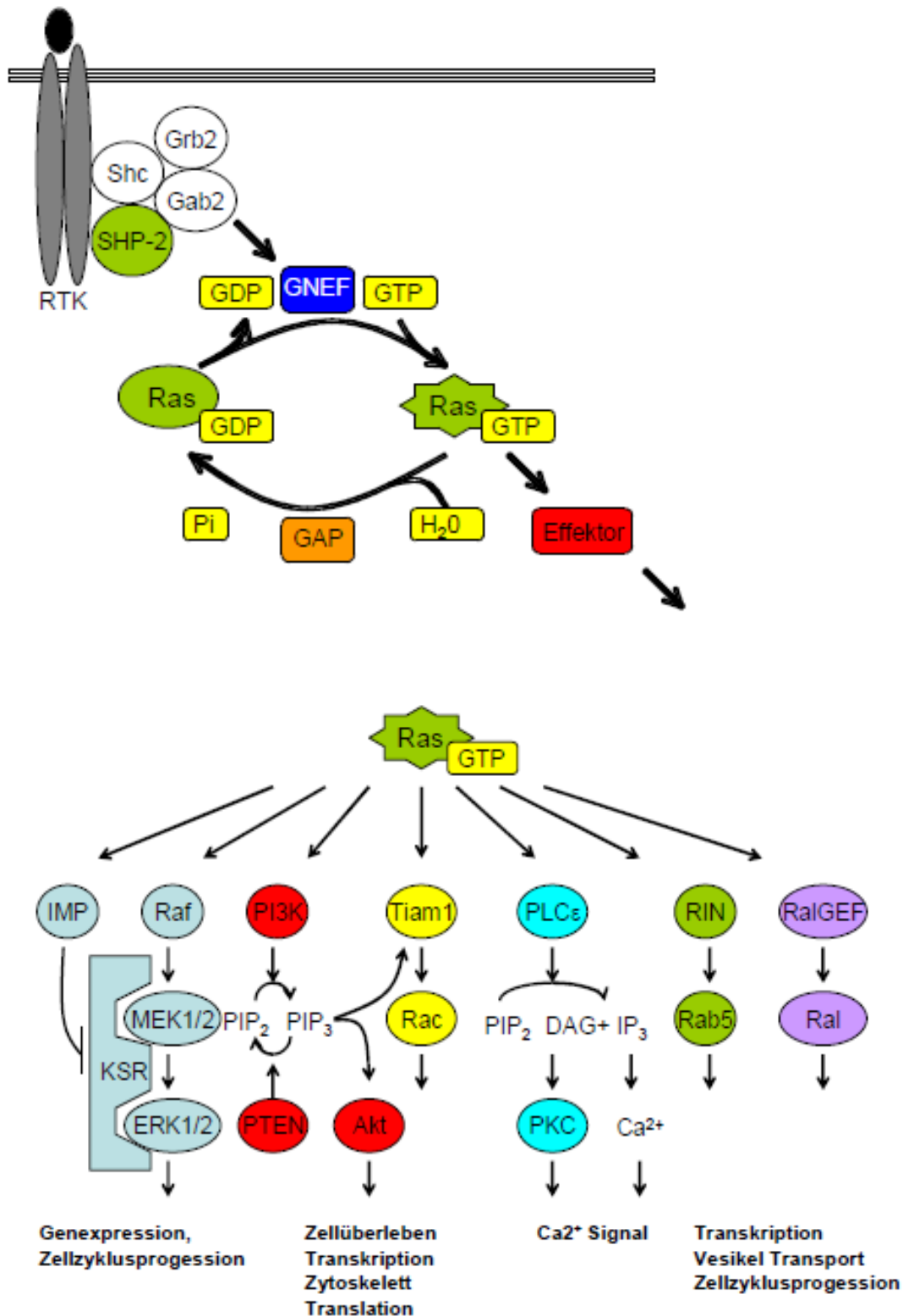


Abb. 2a: Aktivierung der Signalwege von Ras (56)

2b: Aktivierte Ras-Effektorsignalwege (56)

1.2.1.1 Das K-ras-Onkogen im Pankreaskarzinom

Das K-ras-Gen ist ein Plasmamembran gebundenes 21-kD Guaninnukleotid-

bindendes-Protein mit Guanosin-Triphosphatase-Aktivität (GTPase-Aktivität), das über den Austausch von GDP gegen GTP reguliert wird. In Tumorzellen findet man sehr häufig Mutationen in den Genen für Ras, aber auch in den Genen für GAPs oder GEFs. Mutationen dieses Ras-Proteins führen zu einem Verlust der GTPase Aktivität und zur Stabilisierung des aktivierten Ras-GTP-Komplexes, wodurch die Signaltransduktion beeinflusst wird. Durch die verschiedenen downstream Effektoren nimmt aktiviertes K-ras eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und bei der Induktion der Apoptose ein, was die Kanzerogenese unterstützt. Das K-ras-Onkogen gehört zu den häufig mutierten Onkogenen, die menschliche Karzinome verursachen. Beim kolorektalen Karzinom konnten im Primärtumor bei mehr als 40% und bei der chronischen myeloischen Leukämie bei ca. 50% K-ras-Mutationen gezeigt werden. Hruban et al. zeigte, dass jeder Grad von PanINs mit spezifischen genetischen Veränderungen assoziiert ist (35). So finden sich bei PanINs 1A/B K-ras- Mutationen mit einer Prävalenz von bis zu 40% und beim duktalem invasiven Karzinom von 80-90% wieder (2). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass K-ras-Mutationen früh in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms erfolgen und häufig bereits bei präkanzerösen Veränderungen zu finden sind. Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass K-ras-Mutationen eher eine Rolle bei der Initiierung der Kanzerogenese spielen, während p53-Mutationen vor allem für die Progression der Krankheit verantwortlich zu sein scheinen (54).

1.2.2 Der Tumorsuppressor p53

Das Tumorsuppressor p53-Gen ist auf dem Chromosom 17 p lokalisiert und ist ein nukleäres Protein mit 53 kDa, das eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation spielt. Es ist das am häufigsten durch Mutation veränderte Gen, das in menschlichen Tumoren gefunden wurde. An vielen verschiedenen Stellen des Gens wurden Mutationen nachgewiesen, die zu einer Fehlfunktion des p53-Proteins führen. Die Stabilisierung und Aktivierung des Wildtyps p53 reguliert die Aktivierung der G1- und G2- Zellzykluskontrolle. Der Zellzyklus unterteilt sich in Mitose und Interphase mit G1, S- und G2-Phase. Kontrolliert wird er von einem Komplex verschiedener Cycline und einigen Cyclin- abhängigen Kinasen sog CDKS. Der Zellzyklus wird durch Cyklin und CDKs aktiviert. Die Zellproliferation wird durch TGF- β (transforming growth factor β) negativ beeinflusst. Da Cyklin D mit der CDK4-Kinase assoziiert ist, wird dieser Inhibitor als INK4 (inhibitor of CDK4) bezeichnet.

Der Zellzyklus wird durch Checkpoint-Mechanismen kontrolliert, die seinen störungs-freien und zeitlich koordinierten Ablauf sicherstellen. Bei DNA Schädigung, sei es durch UV- Strahlung oder Replikationsfehler führen diese Checkpoint- Mechanismen sowohl in der G1- als auch in der G2- Phase für einen Zellzyklusarrest oder zur Apoptose (52). Das p53-Gen ist ein Transkriptionsfaktor, das die Synthese des CDK-Inhibitor p21 kontrolliert. Als Antwort auf DNA-Schädigungen kommt es zu einem Anhalten des Zellzyklus, da die Aktivität der CDK2-Kinase durch p21 gehemmt und der Beginn der Replikation verhindert wird (Abb.3) (52). Die Replikation bleibt so lange gestoppt, bis der Schaden an der DNA repariert ist. Daneben kann p53 die Transkription von Genen aktivieren, die für proapoptotische Proteine kodieren. Damit eine durch p53 in ihrem Zellzyklus arretierte Zelle die Möglichkeit erhält, einen DNA-Schaden zu reparieren, muss sichergestellt werden, dass die p53-Aktivierung nicht auf jeden Fall zur Induktion von Apoptose führt. Das p53-Gen ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen des Menschen und spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Wachstumskontrolle. Die Mutation des p53- Tumorsuppressorgens wird in humanen Tumoren festgestellt. Sie führt dazu, dass Zellen auch proliferieren, wenn ihre DNA geschädigt ist. Dieses führt zum Phänomen der genetischen Instabilität von Tumorzellen.

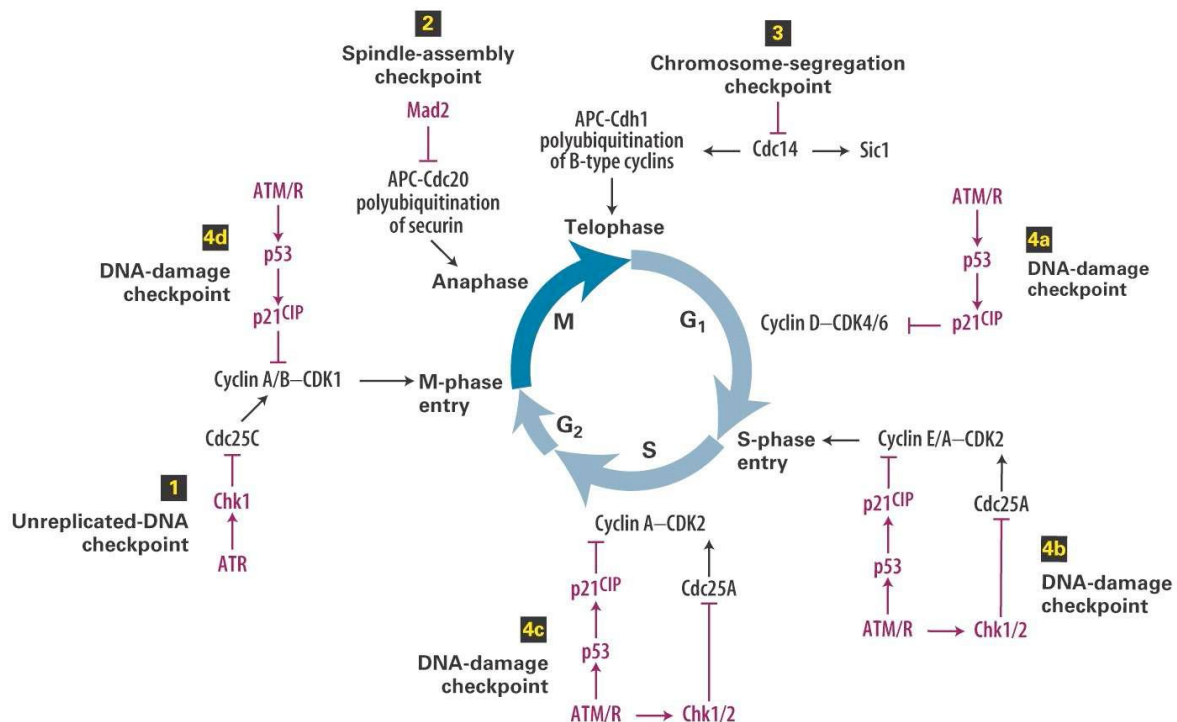


Abb.3 Einfluss von p53 auf den Zellzyklus (52)

1.2.2.1 Der Tumorsuppressor p53 im Pankreaskarzinom

Über die Hälfte an Patienten mit malignen Tumoren weist eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 auf. Beim Pankreaskarzinom zeigt sich in über 70% der Fälle eine p53-Mutation (5,14). Diese p53-Mutationen spielen eine wichtige Rolle bei der Dysplasie und treten in späteren Vorläuferläsionen des PDA (PanIN2 und PanIN3) auf. Ein Verlust der Funktion von p53 induziert das Wachstum der Zellen und verhindert den programmierten Zelltod. Die p53-Mutation wird mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, lokalem Lymphknotenbefall und kürzeren Überlebenszeiten, nicht jedoch mit einer höheren Inzidenz von Fernmetastasen oder einer gesteigerten Tumorgroße assoziiert. Es scheint eine schnellere Progression des Pankreaskarzinoms zu induzieren. Weiterhin scheint der Nachweis von p53-Antikörpern im Serum von Patienten spezifisch für die Malignität der Pankreaserkrankung zu sein (46).

1.3 Molekulare Signalwege im Pankreaskarzinom

Durch folgende verschiedene Signalwege werden die Zellhypertrophie, die Zellproliferation, das Zellwachstum und die Angiogenese induziert.

1.3.1 Die Angiogenese

Für das Tumorstadium und die Metastasierung von Karzinomen spielt die Angiogenese eine bedeutende Rolle. Zu einer Gefäßneubildung kommt es, wenn das Gleichgewicht zwischen angiogenen und angiostatischen Stimuli zugunsten der angiogenen verschoben wird und in den Endothelzellen die Trias von Motilität, Proteolyse und zellulärer Proliferation induziert wird. Von den endogenen angiogenen Faktoren werden der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) am häufigsten in Tumoren gefunden. VEGF ist ein homodimerisches Protein, das die Verbreitung von endothelialen Zellen stimuliert und die Angiogenese durch Chemotaxis-Stimulation fördert. Mehrere experimentelle Studien konnten zeigen, dass Angiotensin II ein wichtiger Stimulus für VEGF ist. Im Angiogenese-Modell von Tamarat et al. konnte eine erhöhte VEGF-Konzentration bei Zugabe von Angiotensin II gefunden werden(70).

Die wichtigsten Regulationsfaktoren der Angiogenese sind Hypoxie, VEGF, bFGF, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Angiotensin II. Die Studie von Young Koh et al. (75) hat gezeigt, dass Angiotensin II die Synthese von Angiopoietin 2 in retinalen

endothelialen Zellen stimuliert, die eine wichtige Rolle bei der Angiogenese der diabetischen Retinopathie spielt. AT_1 -Rezeptor-Hemmer reduzieren die Expression und die Akkumulation von Angiopoietin 2-mRNA (Abb. 9).

Ab einer Tumorgroße von 2 mm kommt es zu einer Unterversorgung des Tumors mit Nährstoffen, hieraus resultieren Hypoxie, Azidose und Hypoglykämie (Abb. 4) und schließlich die Bildung von VEGF. Damit eine Gefäßneubildung induziert werden kann, müssen gleichzeitig Inhibitoren der Angiogenese herunter reguliert werden. Zu den potentesten Inhibitoren der Endothelzell-Proliferation gehören Angiostatin, Plättchenfaktor 4, Transformation Wachstum Faktor ($TGF-\beta$) und Gewebsinhibitoren der Metalloproteinasen. Durch den angiogenen Stimulus werden Endothelzellen veranlasst, die endotheliale Basalmembran zu zerstören, in das perivaskuläre Stroma zu invadieren und Gefäßsprossungen in Richtung des angiogenen Stimulus voranzutreiben. Durch die Induktion von Enzyminhibitoren und der Blockade von Adhäsionsmolekülen, werden dabei Mechanismen, wie bei der Invasion von Tumorzellen in die extrazelluläre Matrix, wirksam (11). Bei über 90 % der Patienten mit einem Pankreaskarzinom werden eine VEGF-Überstimulation und eine verstärkte Angiogenese beobachtet. Aufgrund dieser tumorbiologischen Bedeutung der Angiogenese ist der humanisierte Antikörper Bevacizumab bei Patienten mit Kolonkarzinom zugelassen. In der Studie von Vervenne et al. konnte allerdings bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms mit einer Kombination von Bevacizumab mit Gemcitabin das Gesamtüberleben nicht erheblich verlängert werden, obwohl eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens gesehen wurde (75)

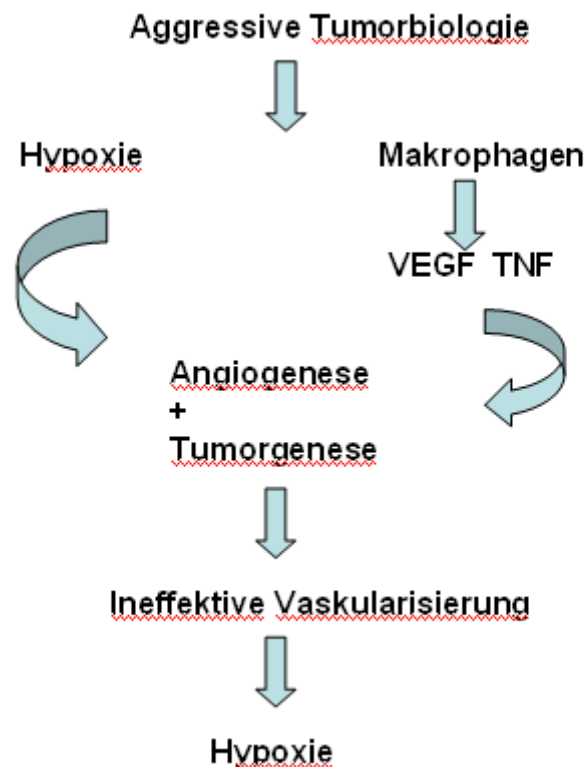


Abb. 4 Tumorwachstum unter Versorgungsmangel

1.3.2 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Die Hemmung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) ist ein großes therapeutisches Ziel bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms. EGFR ist ein transmembranes Glykoprotein, das aus einer extrazellulären Liganden-Verbindungsstelle mit Cystein-reichen Regionen, einem hydrophobem Transmembrangebiet und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase besteht. EGFR ist Mitglied der ErbB-Familie oder EGFR-Familie mit Tyrosinkinase-Rezeptoren, die EGFR-1, ErbB-2 (HER-2), ErbB-3 und ErbB-4 umfasst. Der EGF-Rezeptor gehört auch zu den Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Die Überexpression von ErbB-Signalwegen spielen eine wichtige entscheidende Rolle im Wachstum des Tumors und der Bösartigkeit. Beim Pankreaskarzinom werden EGFR-1, ErbB-2 und ErbB-3 überexprimiert (22,42,77). Die Bindung von Liganden an die extrazelluläre Komponente von EGFR führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosin-Kinase. Diese führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen (Abb. 5), die den Ras-Raf-MEK- (Übertragung von Wachstumssignalen) und den PI3K/Akt-Signalweg (Kontrolle von Zellzyklusprogression und Zellüberleben) sowie die STAT ((Aktivierung von Signaltranslation und Signaltranskription für Überleben, Invasion,

Zelldivison und Adhäsion von Tumorzellen) (49)) anregen. In der Folge wachsen die Tumorzellen unkontrolliert und es kommt zu einer verstärkten Metastasenbildung. Ferner gibt es weniger Sensibilität gegenüber Chemo- oder Strahlentherapie.

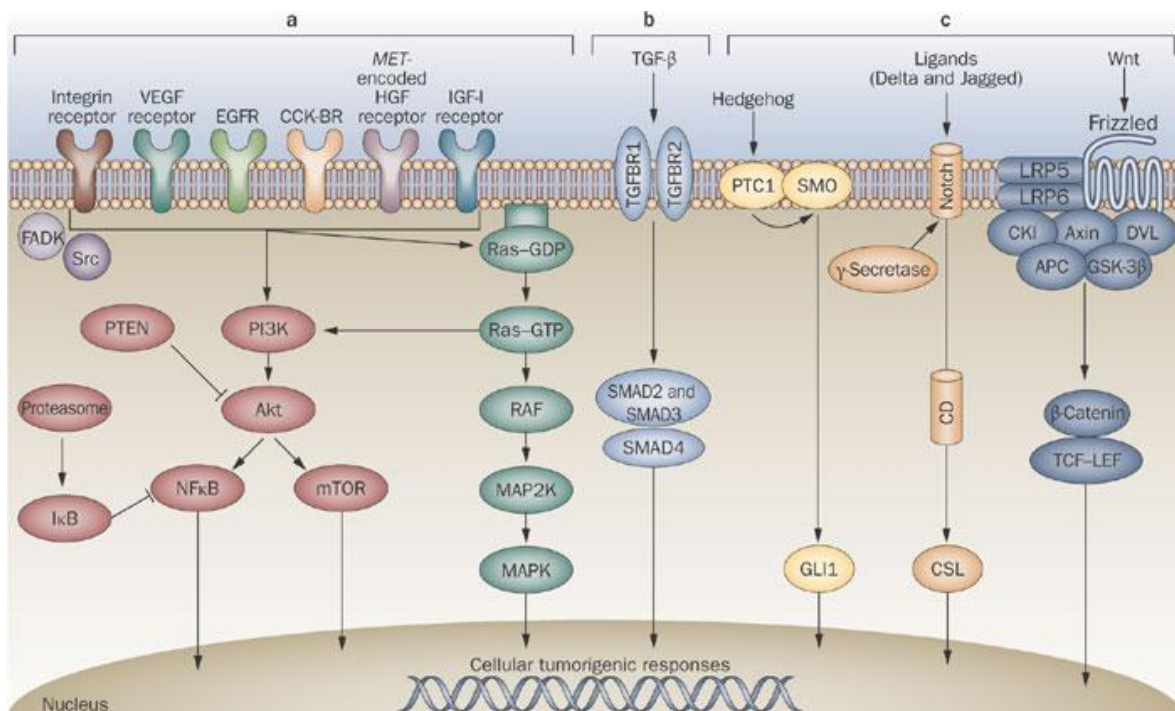


Abb.5 Schematische Darstellung der molekularen onkogenen Signalwege im Pankreaskarzinom(42)

1.3.3 PI3K/Akt-Signalwege

Durch die Bindung der Liganden an den transmembranen VEGF-, EGFR-, HGF-, Insulin-like growth factor-Rezeptor (IGF) und Ras wird der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert (Abb. 5). Die aktivierte Phosphoinositol-3-OH-Kinase (PI3K) katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositol-4,5-bisphosphate zu Phosphoinositol-3,4,5-trisphosphate, die die Phosphoinositol-dependent-Kinase 1 (PDK1) aktiviert. Anschließend wird Akt durch aktivierte PDK1 stimuliert. Der PI3K/Akt-Signalweg induziert weitere Signaltransduktionen und stimuliert den G1/S Übergang im Zellzyklus. Zudem fördert Akt die Proliferation und das Überleben der Zellen, indem es NF-κB und mTOR aktiviert. Die Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs wird durch das Tumorsuppressorgen PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) und chemische Inhibitoren z.B Wortmannin oder LZ294002 runterreguliert, indem es PI3K dephosphoryliert. Akt phosphoryliert die verschiedenen Substanzen, die eine entscheidende Rolle im Wachstum der Zellen, Überleben, Stoffwechsel der Glucose, und der Translation der Proteine spielen. Aktivierte Akt inhibiert die Funktion der proapoptotischen Proteine Bcl2-Antagonist

causing cell death (Bad) und Caspase 9 (61). Durch die Inhibierung von Gegenspielern kann BAD seine antiapoptotische Wirkung voll entfalten. Zudem fördert Akt das Überleben und die Proliferation von Zellen, indem es Transkriptionsfaktor "nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells" (NF- κ B) und "mammalian target of rapamycin" (mTOR) aktiviert. mTOR reguliert den zellulären Kata- und Anabolismus, die Zellproliferation und das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen (8,25,65). Bei Studien zeigt sich eine erhöhte Aktivität von mTOR und von NF- κ B in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien sowie in resezierten Pankreaskarzinomen (8,9). NF- κ B reguliert die Immunantwort, die Zellproliferation und den Zelltod. Die Aktivierung von NF- κ B spielt eine wichtige Rolle für die Entstehung von Entzündungen und die Entwicklung des Immunsystems und der lymphatischen Organe. Hennessy et al 2005 zeigte, dass der PI3K/Akt-Signalweg das Überleben der Zellen fördert und eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt (28). Die Überexpression von Akt1 wurde im Magenkarzinom und die Überexpression von Akt2 in Brust-, Ovarien-, Pankreaskarzinom festgestellt. In mehreren experimentellen Studien wurde bei bis zu 60% der Patienten mit einem Pankreaskarzinom eine verstärkte Aktivierung von Akt und des PI3K/Akt-Signalweges im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe und benignen Pankreastumoren festgestellt (3,17,58,60). Bemerkenswerterweise fanden die Autoren eine signifikante Korrelation zwischen Akt-Aktivierung und schlecht differenzierten Pankreaskarzinomen (3,17,58,60). Eine Mutation des PTEN wurde als eine Grundlage für die Ausbildung von Tumoren angenommen. Die Inhibierung des PI3K-Akt-Signalweges wird darum als ein neuer Therapieansatz bei Pankreaskarzinom angesehen (59).

1.4 Das Angiotensin-System

Angiotensin II ist ein Peptidhormon und ein wichtiger Effektor im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das für die Aufrechterhaltung des Blutvolumens verantwortlich ist und auf Salz- und Wasserverluste reagiert. Die Aktivität dieses Systems beginnt mit der Exozytose von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere bei raschen Volumenveränderungen. Renin spaltet im Plasma von Angiotensinogenmolekülen ein N-terminales Dekapeptid ab, das Angiotensin I, welches durch das *angiotensin-I-converting enzyme* (ACE) zum Angiotensin II verkürzt wird. Angiotensin II spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung von

Blutdruck und Extrazellulärvolumen. Es löst in glatten Gefäßmuskelzellen eine Kontraktion aus, welche in verschiedenen Gefäßgebieten zu einer Vasokonstriktion und zu einer Erhöhung des Kreislaufwiderstands führt. Stoll et al. zeigte (68), dass Angiotensin II Zellwachstum, Apoptose und Zelldifferenzierung reguliert. Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, der Konformation von extrazellulärer Matrix, bei Entzündungen und der Stimulierung der Herstellung von mehreren Wachstumsfaktoren, wie der Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF), epidermal Wachstumsfaktor (EGF), Transforming-Wachstumsfaktor-Beta b (TGFb), Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), basisch-Fibroblast-Wachstumsfaktor (bFGF), vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und Thrombozyten-Aktivator-Faktor (PAF). Angiotensin II reguliert die Zellproliferation und die Herstellung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors durch Aktivierung der Rezeptoren AT₁ (antiproptotic) und AT₂ (proapoptotic). Außerdem stimuliert es die Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde durch den Angiotensin-II-Rezeptor AT₁ (68).

Die AT₁- und AT₂-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und führen über Aktivierung der Phospholipase C u.a. zu einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg.

1.4.1 Der Angiotensin-Rezeptor

AT₁-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Eine Stimulation des AT₁-Rezeptors erzeugt mehrere Effekte:

- (1) Vaskuläre Auswirkungen: Blutdruckerhöhung, zum einen durch arterielle und venöse Vasokonstriktion, andererseits durch die Ausschüttung von Aldosteron, Endothelin-1(ET-1) und Vasopressin, welche die Wasserabsorption im distalen Tubulus und im Sammelrohrsystem der Niere erhöhen. Dies führt zu einer Steigerung des Blutvolumens und somit zu einer Verminderung des Urinvolumens. Durch AT₁-Rezeptor-Stimulation wird die vaskuläre Reserve von Koronar- und Gehirngefäßen verringert und die arterielle Distensibilität sinkt (26,44,74).
- (2) Aktionen auf das Myokard: Unter anderem erhöhte Kontraktilität, Steigerung der Herzfrequenz und des Sauerstoffbedarfs sowie intensive koronare Vasokonstriktion.
- (3) Zellproliferation und Apoptose: Durch eine AT₁-Rezeptor-Stimulation wird eine erhöhte Phenylalanin-H³-Konzentration nachgewiesen, die als Marker der Proteinsynthese und Hypertrophie angesehen wird. Sie induziert die Aktivierung von

Proteinkinasen und die Expression von mehreren Wachstumsfaktoren, welche die Kollagen- und Lamininsynthese erhöhen. Diese verursachen letztendlich eine Herzfibrose, eine diastolische Herzinsuffizienz und sowie Herzarrhythmien. AT₁-Rezeptor-Stimulation stimuliert die Zellproliferation und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor und hemmt die Apoptose. Im Gegensatz zum AT₂-Rezeptor hat die Aktivierung des AT₁-Rezeptors einen antiapoptotischen Effekt.

(4) Proinflammatorische und proatherothrombotische Aktionen: Die Stimulation des AT₁-Rezeptors aktiviert das Zusammenspiel von Monozyten und Endothelzellen durch Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1), weiterhin die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF α , IL-6), sowie die Migration von Monozyten zu subepithelialen Geweben (70).

(5) Renale Effekte: Eine Vasokonstriktion und ein verminderter renaler Blutfluss ohne eine Änderung der glomerulären Filtration wurden nachgewiesen; durch AT₁-Rezeptor-Stimulation wird die Reabsorption von Natrium und die Ausscheidung von Kalium im proximalen Tubulus erhöht. AT₁-Rezeptoren stimulieren auch die Herstellung und Freisetzung von Aldosteron, Katecholaminen, Vasopressin, adrenocortikotropem Hormon (ACTH), Prolaktin und Luteinisierendes Hormon (LH) was zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt.

AT₂-Rezeptoren bestehen aus 363 Aminosäuren und deren Stimulation erzeugt folgende Effekte:

(1) Vaskuläre Effekte wie die arterielle Dilatation im Gehirn.

(2) Effekte von Proliferation, Differenzierung und Apoptosen. Die antiproliferative Wirkung wurde in koronaren Endothelzellen, mesangialen Zellen und Phäochromozytom nachgewiesen.

(3) Auswirkungen auf Diurese und Natriurese .

(4) Die Freisetzung von Prostaglandinen, LH und Somatostatin. Unter physiologischen Bedingungen hemmt der aktivierte AT₂-Rezeptor das Zellwachstum und induziert Apoptose und Vasodilatation ((33,72) (Tabelle 2)).

	AT ₁	AT ₂
BLOOD VESSELS	Arteries and veins vasoconstriction	Brain artery vasodilation
HEART	Increased contractility and heart rate Increased oxygen requirements Coronary vasoconstriction	
TROPHIC ACTIONS	Increased DNA and protein synthesis. Heart hypertrophy, hyperplasia and remodeling. Stimulation of angiogenesis	Cell growth and differentiation Inhibition of angiogenesis Activation of heart collagenases Antiproliferation and Apoptosis
CENTRAL ACTIONS	Increased sympathetic tone Vasopressin, ACTH, LH and prolactin release.	Brain artery vasodilation Prostaglandin release Increased potassium conductance LH and somatostatin secretion Motor activity and sensitive information.
RENAL ACTIONS	Vasoconstriction Mesangial contraction and proliferation Increased proximal tubular sodium reabsorption Increased renal potassium excretion Increased prostaglandin synthesis Inhibition of renin secretion	Increased proximal tubular sodium reabsorption

Tabelle 2: Effekte von AT₁-und AT₂-Rezeptor-Stimulation(20)

1.4.2 Intrazelluläre Signalwege von AT₁- und AT₂- Rezeptoren

Der AT₁-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und führen über Aktivierung der Phospholipase C (PLC) u.a. zu einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg, der Phosphatidylinositol-Biphosphate in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet (12,74). IP3 wirkt auf bestimmte Rezeptoren des Sarkoplasmatischen Retikulums und erhöht die Freisetzung von Kalzium. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die die Phosphorylierung von mehreren Signalwegen stimuliert und die Transkription von Proteinen Signal transducers and activators of transcription (STAT) aktiviert. Außerdem aktiviert der AT₁-Rezeptor fokal Adhäsionkinase (FAK), die im Weiteren die G-Proteine, Ras, Src und Raf aktivieren. Der Endeffekt ist die Phosphorylierung von STAT. Die aktivierten STATs fördern die Transkription von Genen, die eine Zellhypertrophie und Zellhyperplasie stimulieren und die Caspase und Apoptose hemmen. Anschließend wurden Interferon-α, vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGFb) produziert (72). Der AT₁-Rezeptor aktiviert die Phospholipase A und D (PLA2 und PLD), die die Synthese von Leukotrien, Thromboxan und Prostaglandin E2 induzieren, die proinflammatorische Eigenschaften haben. Der AT₂-Rezeptor aktiviert mehrere Phosphatasen wie Serin/Threonin Phosphatase-2 (PP2A), Mitogen aktiviert er die Protein-Kinase-Phosphatase 1 (MKP-1), Src-Homologie (SH) 2 Protein, und die Tyrosin-Phosphatase (SHP-1), die ERK inaktivieren und die

Calciumausschüttung hemmen. Die Inaktivierung von ERK führt zur Dephosphorylierung von STATs. Der AT_2 -Rezeptor induziert die Produktion von Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und die Synthese von NO, die die Guanylcyclase (GC) aktiviert und die Produktion von cGMP induziert. Die AT_2 -Rezeptor-Stimulation führt zur Vasodilatation (32,69). Zusammenfassend wirkt der AT_1 -Rezeptor antagonistisch zum AT_2 -Rezeptor.

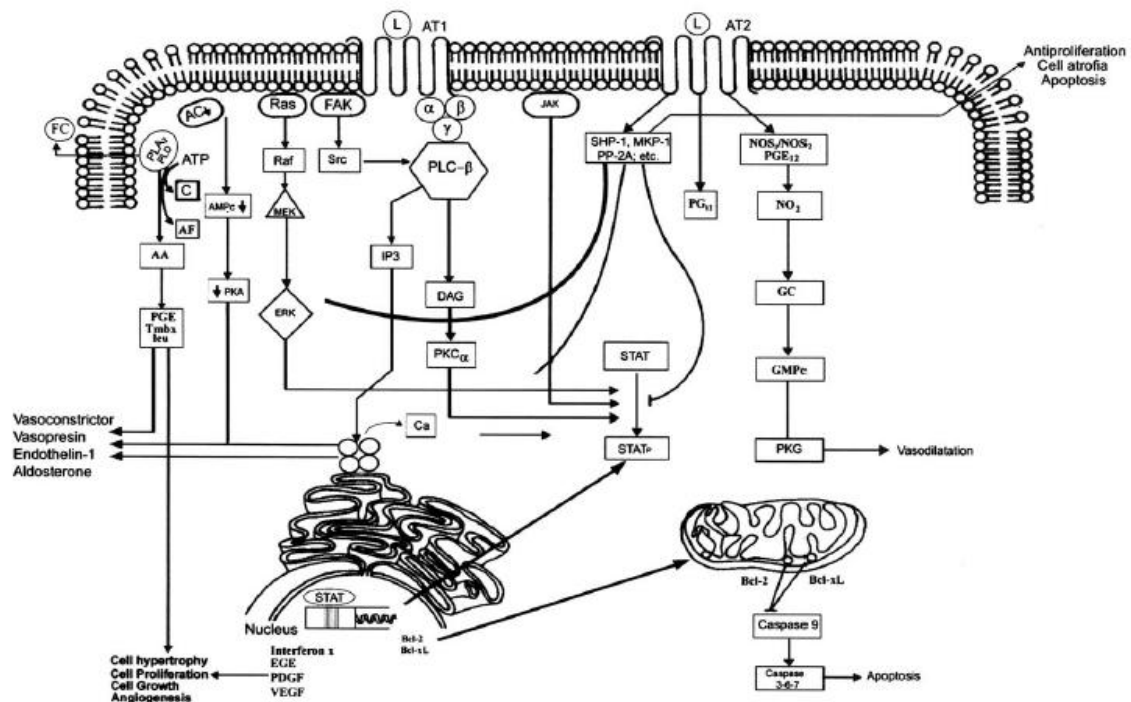


Abb.6 Signalwege von AT_1 - und AT_2 - Rezeptoren (20)

1.4.3 Angiogenese durch Angiotensin II

Stoll et al. (68) zeigte, dass Angiotensin II die Angiogenese durch die Regulation der Expression von Wachstumsfaktoren sowie VEGF, ANGPTL4, IGF, PDGF, TGF- β , FGF und HGF induziert. Dadurch führt es zur Zellproliferation, zur Hemmung von Apoptose und zu proinflammatorischen Effekten in Endothelzellen. VEGF ist ein homodimerisches Protein, das die Verbreitung von endothelialen Zellen stimuliert und die Angiogenese durch Chemotaxis-Stimulation fördert. Die gleiche Studie zeigte, dass Angiotensin II ein wichtiger Stimulator der VEGF ist. Im Angiogenese-Modell wurde ein erhöhter VEGF von 144% im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt, wenn man von extern Angiotensin II im Experiment dazu gibt. Die Angiotensin II-induzierte Angiogenese wurde durch AT_1 -Rezeptor-Hemmer oder Antikörper gegen VEGF blockiert. Anschließend ist die Angiogenese VEGF-

abhängig und durch AT_1 -Rezeptor stimuliert (70). Die wichtigsten Regulationsfaktoren der Angiogenese sind Hypoxie, VEGF, FGFb, TNF und Angiotensin II (79). Young et al. (79) hat gezeigt, dass Angiotensin II die Synthese von Angiopoietin 2 aber nicht Angiopoietin 1 in retinalen endothelialen Zellen stimuliert, eine AT_1 -Rezeptor-Hemmung reduziert die Expression und die Akkumulation von Angiopoietin 2-mRNA (Abb.7).

Rouet et al. hat gezeigt, dass Angiotensin II eine proinflammatorische Funktion hat, freie Sauerstoff-Radikale zu produzieren, proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6(IL-6) oder Zellen-Adhäsion-Molekülen freizusetzen, die durch nukleare Faktoren-kB (NF-KB) und Proteinkinase C aktiviert wurden (57). Während entzündliche Prozesse und Cyclooxygenase-2 (COX-2) die Angiogenese regulieren (7,73), stimuliert Angiotensin II die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen und erhöht auch die Expression von COX-2. Die Angiogenese-Effekte wurden durch AT_1 -Rezeptor-Hemmer oder COX-2-Hemmer blockiert (70).

Angiotensin II begünstigt die Angiogenese durch Überexpression von Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS), die von VEGF reguliert wurde. Bei Ischämie werden erhöhte Stickstoffmonoxid- und NOS-Konzentrationen festgestellt, die den Gefäßdruck regulieren (50).

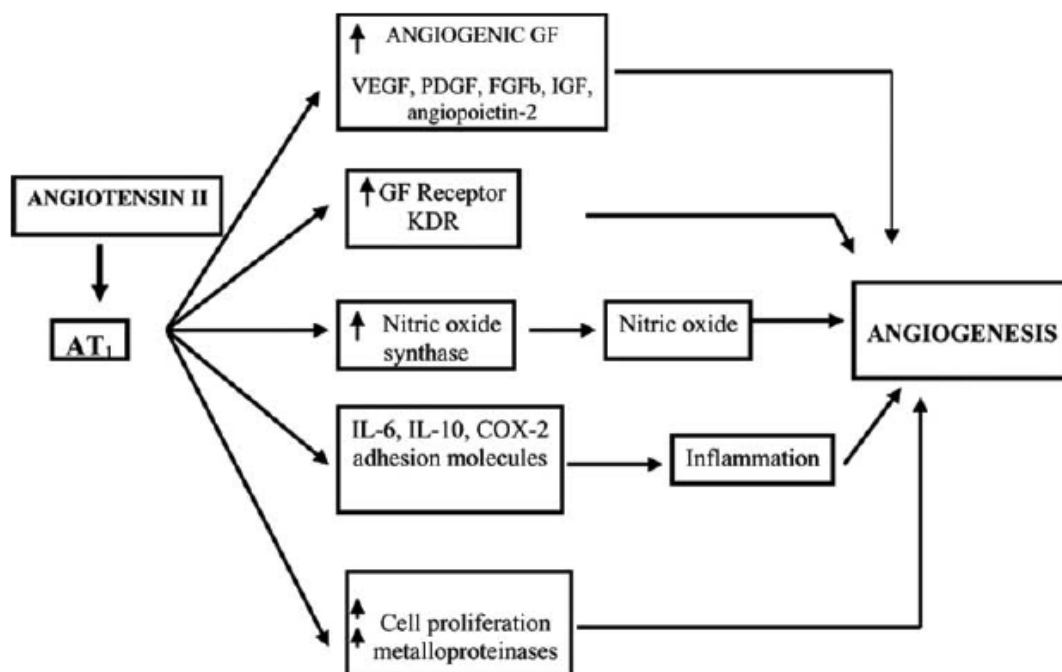


Abb. 7 Mechanismus der Angiogenese (20)

1.4.4 Angiotensin II- Überexpression beim Pankreaskarzinom

VEGF spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese im dukta-

Adenokarzinom des Pankreas. Im gesunden Pankreasgewebe beschränkt sich die VEGF-Expression auf Inselzellen im Pankreas. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass eine Lymphknotenmetastasierung sowie die Prognose abhängig sind von einer erhöhten VEGF-Konzentration und der Anzahl an VEGF-Rezeptoren (15,36,3764). In der Studie von Arafa et al. wurde ein Zusammenhang zwischen Angiotensin II und AT1-Rezeptor und VEGF gezeigt, dass Angiotensin II die mRNA-Expression von VEGF in endothelialen Zellen und im duktalem Adenokarzinom des Pankreas induziert (6, Abb. 8). Die Inhibierung von ACE wird als eine neue Chemoprävention bei Patienten mit chronischen Pankreatitis oder Onkogen-Mutationen angesehen. Im Pdx-1-Cre;Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+} Mausmodell konnte ebenfalls eine starke Expression von ACE bereits in den PanINs der Mäuse nachgewiesen werden (76).

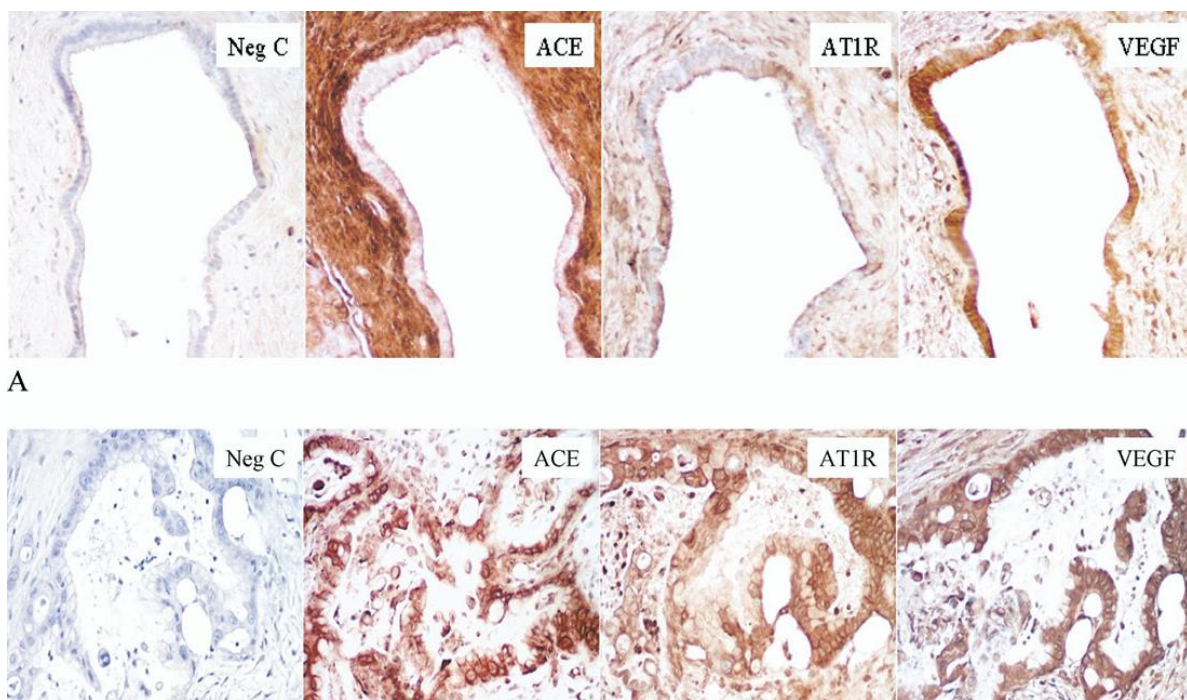


Abb.8 Im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zeigte sich im Gegensatz zu normalem Pankreasgewebe auch eine Überexpression von ACE, AT1-Rezeptor und VEGF (6).

1.5 Pankreaskarzinom im Tumormausmodell

2003 war ein Tumormausmodell von der Arbeitsgruppe von David Tuveson entwickelt worden, bei dem eine onkogene Form von K-ras unter der Kontrolle des pankreasspezifischen Pdx1-Promoters exprimiert wird (30). Die Mutation ist flankiert von Lox-Stop-Lox (LSL)-Elementen, die die Transkription und Translation zunächst verhindern. Die Expression des mutierten Allels wird dadurch erreicht, dass die LSL-Kras^{G12D}-Mäuse mit Mäusen gekreuzt werden, die die Cre-Rekombinase unter der

Kontrolle des Pdx1-Promoters exprimieren. Dies führt zum Herausschneiden des LSL-Elements und zur Expression der onkogene Form des K-ras Proteins (30). Die aktivierenden Mutationen treten in der Regel an bestimmten Stellen des Ras-Gens (T→A Transversion in Kodon 12, 13 und 61) auf. Das Ergebnis von dieser Studie zeigte, dass alle transgenen Pdx1-Cre-LSL-Kras^{G12D}-Mäuse (33 von 33) unterschiedliche PanIN-Läsionen entwickelten, die den humanen Vorläufern des Pankreaskarzinoms entsprechen. Außer PanIN-Läsionen entwickelten transgenen Pdx1-Cre-LSL-Kras^{G12D}-Mäuse mucokutane Papillome und intestinale Neoplasien. In 6.6 % der transgenen Pdx1-Cre-LSL-Kras^{G12D}-Mäusen (2 von 29) traten invasive und metastasierte Pankreaskarzinome auf. 2005 entwickelte die gleiche Arbeitsgruppe ein weiteres Tumormausmodell, bei dem nicht nur die onkogene Form von K-ras sondern auch P53 unter der Kontrolle des pankreasspezifischen Pdx1-Promoters exprimiert wird (Abb. 9). Das Kreuzen von LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+} Mäusen mit Pdx-1-Cre Mäusen hatte dramatische Auswirkungen. LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre Mäuse hatten eine mittlere Überlebenszeit von nur 5 Monaten. Alle LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre Mäuse (n=28) starben nach 12 Monaten und 96% (27/28) der dreifach mutierten Mäusen entwickelten ein invasives Pankreaskarzinom mit malignem Aszites, Kachexie und abdominaler Distention, wie Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom (Abb.10). Die Metastasen von mutierten Mäusen traten in Leber (70%), Lunge (50-60%), Nebennieren (20%) und Peritoneum (20-30%) auf, das heißt genauso wie beim humanen Pankreaskarzinom (31). Bis zu einem Alter von 4-6 Wochen fanden sich keine histologischen Veränderungen des Pankreas von Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre Mäusen. Signifikante Symptome traten frühsten ab einem Lebensalter von 10 Wochen auf (31).

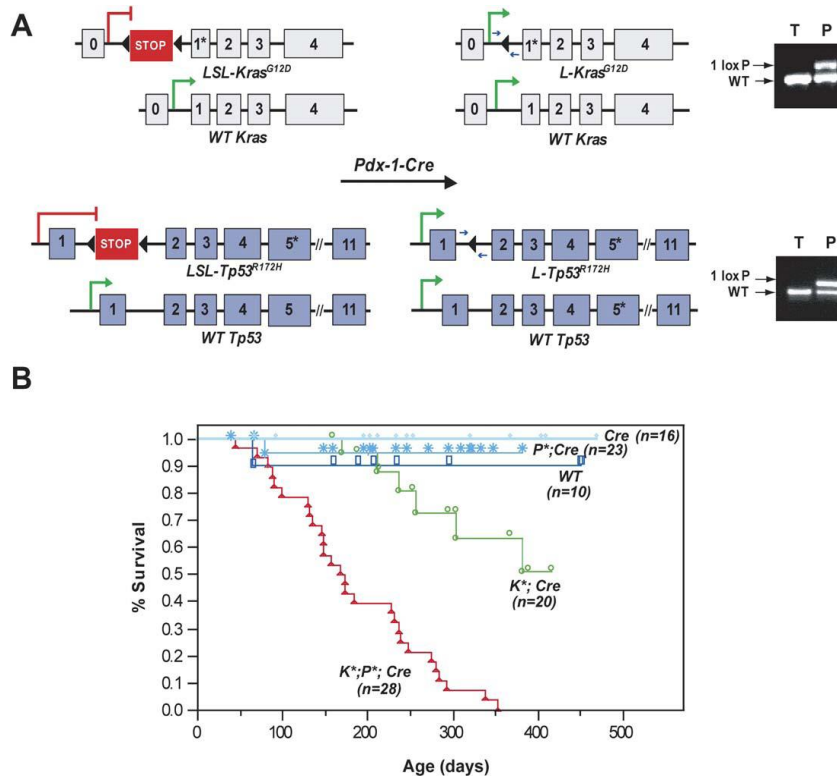


Abb.9: (A) Konstrukt der transgenen LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+;Pdx-1-Cre Mäuse (B) Überlebenszeit von Mäusen in verschiedenen Gruppen(31)

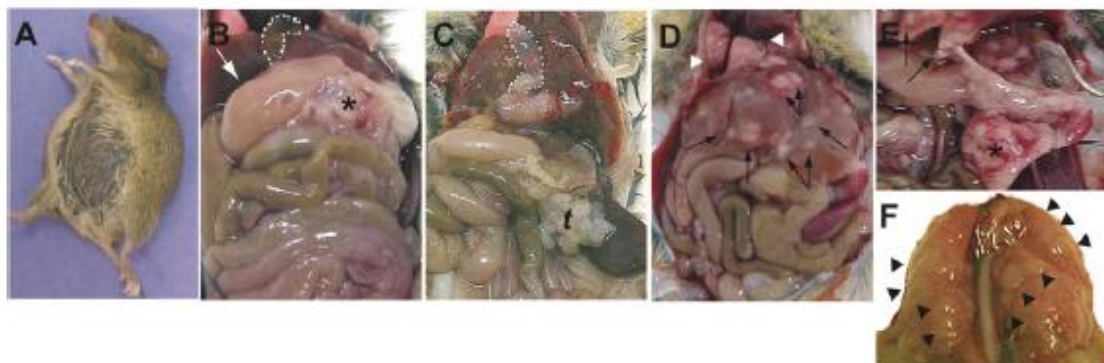


Abb.10: LSL-KRASG12D/+;LSL-TP53R172H/+;Pdx-1-Cre-Mäuse: (A) Maus mit malignem Aszites, (B) Primäres Pankreaskarzinom (Stern) mit Kompression des proximalen Duodenums (Pfeil), (C) gestaute Gallenblase (markiert), (D) multiple Lebermetastasen (31).

1.6 Zielsetzung

Patienten mit Pankreaskarzinom haben meistens eine sehr schlechte Prognose und weniger als 2% davon überleben die ersten fünf Jahre. Die Transformationsprozesse der Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Pankreaskarzinoms wurden auch festgestellt, die als sogenannte *Pancreatic Intraepithelial Neoplasias* (PanIN) bezeichnet wurde. Ein Tumormausmodell von der Arbeitsgruppe David A. Tuveson zeigte, dass die transgenen Mäuse die ähnliche Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Pankreaskarzinoms hatten, die dem humanen Pankreaskarzinom entspricht. In

Studien wurden auch die Funktion von ACE-Hemmern bestätigt, die als Chemoprävention gegen das Pankreaskarzinom wirkten (40,45,78). Im $Kras^{G12D/+}, LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre$ Mausmodell bietet sich die Möglichkeit, die Auswirkungen einer Chemoprävention mit ACE-Hemmer auf die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms zu untersuchen, die das Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms des Menschen widerspiegelt.

1.7 Fragestellung

1. Hat Enalapril chemopräventive Auswirkungen auf die Entwicklung des Pankreaskarzinoms?
2. Kann die Progression von PanINs zum invasiven Pankreaskarzinom durch Chemoprävention mit Enalapril nur verlangsamt oder teilweise gestoppt werden?
3. Bewirkt die Chemoprävention in der Behandlungsgruppe eine signifikante Reduktion der PanIN- Grade im Vergleich zur Kontrollgruppe?
4. Ist eine Toxizität der Medikamente zu verzeichnen?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Mauslinie

Dem Antragssteller werden durch den Kooperationspartner Prof. Maitra alle drei transgenen Mauslinien zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Geräte und Zubehör

Gerät	Hersteller
20°C Schrank, Froster	Bosch, Gerlingen, D
- 80°C Schrank, Sepatch	Haraeus, Hanau, D
+ 4°C Schrank, KGS 3213 - 5	Liebherr, Biberach, D
Agarosegelträger , Maxi II	Labortechnik, Wasserburg, D
Analysenwaage, Explorer	Ohaus, Gießen, D
Analysenwaage, 572	Kern, Albstadt, D
Autoklav	Biomedis, Gießen, D
Brutschrank, Thermo B 20	Hareaus, München, D
Destilliere, Arium 611	Sartorius, Göttingen, D
Digitalkamera, Dimage X 50	Konica Minolta, Unterföhring, D
Eismaschine, 072816	ZIEGRA, Isernhagen, D
Elektrophoresenetzgerät, Power Pac 300	BioRad, München, D
Elektrophoreselaufkammer, Sub - Cell GT	BioRad, München, D
Feuchte Kammer	Eigenkonstruktion
Gasbrenner, CV470 Plus Butan/ Propan	Campingaz, Ober-Mörlen, D
Gewebeeinbett- Entwässerungsautomat, Tissue-Tek VIP E150	Sakura, Torrance, USA
Heizblock, Dri - Block DB	Techne, Princeton, USA
Homogenisator/ Shaver, Ultra-Turrax T25 digital	IKA-Werke, Staufen, D
Kühlplatte, Tissue-Tek	Sakura, Torrance, USA
Magnetrührer, MR 2002	Heidolph, Kehlheim, D
Mikroskop (binokular), 020-519.511 (1.6x, 2.5x, 10x, 40x)	Leica, Bensheim, D
Mikroskopkamera, DFC 290	Leica, Bensheim, D
Mikrotom, RM 2155	Leica, Bensheim, D
Mikrowelle, 8017	Privileg, Fürth, D
Markerstift, Super PAP Pen	Zymed, San Francisco, USA
Paraffinspender/ Ausgießstation, Tissue-Tek TEC	Sakura, Torrance, USA
Paraffinstreckbad, WB 24	Medax, Rendsburg, D
Paraffinwärmeplatte, 13501	Medax, Rendsburg, D
pH-Meter, Ultra Basic	Denver Instruments, Göttingen, D
Pipetten, Reference 2,5µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten, Pipetman 20µl, 200 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen, D
qRT-PCR-Gerät, 7500 FAST-Real-Time PCR System	Applied-Biosystems, Darmstadt, D
Quarzküvette, Präzisions-Küvette Suprasil (10mm)	Hellma, Mühlheim/ Baden, D
RNA Photometer, Ultraspec 3000	Pharmacia, Uppsala, S

Schüttelwasserbad, 3047	Lottermann,D
Shavermesser, Surgical Disposable Scalpel	Braun, Melsungen, D
Sterile Werkbank , Nunc 20229	Fisher Scientific, Langenselbold, D
Thermocycler, Mastercycler EP	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozentrifuge, Centrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg, D
Transluminator, Transluminator 4000	Stratagene, Heidelberg, D
Transilluminatorkamera, M 49	Hama, Monheim, D
Tubes, Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Vakuumzentrifuge, Speed Vac Concentrator	Savant, Ramsey, D
Vortexer, REAX 1 DR	Heidolph, Kehlheim, D
Wasserbad, 1002	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge, Biofuge Pico	Hareaus, München, D

2.1.3 Gebrauchswaren

Produkt	Hersteller
Deckgläser, 24x24mm, 24x46mm	Menzel, Braunschweig, D
Einbettkassetten, Bio-Net Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde, D
Einmalspritzen, 3ml, 10ml	Braun, Melsungen, D
Einmalspritzen/ Insulinspritze, 1ml	Becton Dickinson, Madrid, SPA
Falcon – Röhrchen/ PP-Röhrchen, Cellstar 5ml, 50ml	Greiner Bio - One, Frickenhausen, D
Feinschliffnadel	
Filtereinheit (steril), MILLEX GP, 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, D
Filtersystem (steril), Stericup Express PLUS 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, D
Handschuhe, puderfrei, Nobaglove	Kobe, Marburg, D
Mikrotomklingen, S35	Feather, Osaka, J
Objektträger, SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, D
Einschlussmittel, Roti - Histokitt II	Roth, Karlsruhe, D
Ohrmarken, 1005 - 1 Manel	National Band and Tag, Newport, USA
Ohrmarkenzange	National Band and Tag, Newport, USA
Petrischalen, Tissue Culture Dishes (94mm x 16mm)	Greiner Bio - One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, ep T.I.P.S Standard 200µl, 500µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen (gestopft), SafeSeal 200µl, 100µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, Eppendorftubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, PP-PCR-Gefäß 0,2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Schraubdeckelgefäß	
Skalpelle, steril, Surgical Disposable Scalpel (Gr. 22)	Aesculap, Tuttlingen, D
Wischtücher, Kimwipes Lite	Kimberly - Clark, Koblenz, D

2.1.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden in Analysequalität oder in Qualität für die molekularbiologische Forschung bezogen und verwendet. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die mit *gekennzeichneten Produkte wurden bei +4°C gelagert.

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol *	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aqua dest. (steril), Aqua ad iniectabilia	Delta Select, Dreieich, D
Borsäure	Fisher Scientific, Schwerte, D
Bromphenolblau	Sigma, München, D
Citrat	Sigma, München, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
DAB Chromogen *	Dako, Hamburg, D
DTT (0,1M)	Roth, Karlsruhe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (99+%)	Arcos Organics, Geel, B
Eosin Lösung, alkoholisch (0,5%)	Sigma - Aldrich, München, D
Ethanol, vergällt (≥99%)	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, absolut (≥99%)	JT Baker, Griesheim, D
Ethidiumbromid (1%) *	Roth, Karlsruhe, D
Formaldehyd (3,5 – 3,7% neutral gepuffert)	Fischar, Saarbrücken, D
Foramid	Sigma, München, D
Hämalaun, sauer nach Mayer	Dako, Glostrup, DEN
Methanol	Fisher Scientific, Schwerte, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt, D
Paraffineinbettmedium, Hist- COMP (SP 56°C)	Vogel, Gießen, D
Salzsäure (1 mol/l)	Merck, Darmstadt, D
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (99%+)	Acros Organics, Geel, B
Trizol *	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween (20%) *	Serva, Heidelberg, D
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt, D
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, D
Xylol (≥98%)	JT Baker, Griesheim, D
Wasser (PCR), steril	Sigma, München, D

2.1.5 Enzyme und Nukleotide

Alle folgenden Enzyme und Nukleotide wurden bei +4°C gelagert.

Produkt	Hersteller
DNA - Größenstandard, Gene Ruler 50bp (0,5µg/ µg)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (10mM)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D

Reverse Transkriptase, Super Script III (200U/ µl)
RNAse (steril)

Invitrogen, Karlsruhe, D
Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.6 Puffer und Stammlösungen

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden bei +4°C gelagert.

2.1.6.1 Puffer

Produkt	Hersteller
BSA (pH 5,2)	Serva, Heidelberg, D
DAB Substrat Puffer	Dako, Hamburg, D
DNA Ladepuffer/ Loading Dye (6x)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
First Strand Buffer (5x), cDNA - Synthese	Invitrogen, Karlsruhe, D
Krebs – Ringer - Puffer	Sigma - Aldrich, München, D
PBS - Dulbeco (1x) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Biochrom, Berlin, D

2.1.6.2 Stammlösungen

Zum Ansetzen und Verdünnen von Stammlösungen wurde doppelt deionisiertem Wasser verwendet. Insofern ein bestimmter pH-Wert angestrebt wurde, wurde dieser mit Hilfe von Natriumhydroxid (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl) eingestellt.

Art der Lösung	Inhalt
Blocking Solution (10%)	1g BSA ad 10ml PBST
Citratpuffer (pH 6,0)	2,94g Citrat ad 1l H_2O
DNA-Ladepuffer	40ml Foramid 40mg Bromphenolblau 40mg Xylencyanol 800µl EDTA (0,5M) pH 8,0 ad 100ml H_2O
HBC/ PBS-Lösung (45%)	45g HBC ad 100ml PBS
Krebs – Ringer – Bicarbonat – Puffer (pH 7,3)	9,5g Krebs- Ringer- Fertigpulver 1,26g Natriumbicarbonat (NaHCO_3) ad 500ml H_2O
Methanol- Wasserstoffperoxid- Lösung	10ml H_2O_2 (30%) ad 100ml H_2O
PBST (1%)	500µl Tween

	ad 500ml PBS
TBE (10x), Lagerung bei RT	108g Tris (hydroxymethyl) amino-methane 55g Borsäure 8,2g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ad 1l H ₂ O

2.1.7 Antikörper

Alle Antikörper und sekundären Konjugate wurden bei +4°C gelagert.

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Ursprungsspezies	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
α – NF-κB	Kaninchen	polyklonal	1:100	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
α – Amylase	Kaninchen	polyklonal	1:500	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
α – AT1	Ziege	polyklonal	1 :100	Santa Cruz, California, USA
α – Nestin	Ziege	polyklonal	1:500	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Twist(C-17)	Ziege	polyklonal	1:200	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Pdx 1	Ziege	polyklonal	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Snail	Ziege	polyklonal	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
α – Meerschweinchen	Peroxidase	1:250	Vectastatin, Burlingame, USA
α – Ziege	Peroxidase	1:250	Vectastatin, Burlingame, USA
α – Kaninchen	Peroxidase	1:250	Vectastatin, Burlingame, USA
α – Maus	Peroxidase	1:1	Zymed, San Francisco, USA

2.1.7.3 Sekundäre Konjugate

Konjugatkomplex	Kopplung	Verdünnung	Hersteller
Avidin – Biotin	Peroxidase	1:40	Vectastatin, Burlingame, USA
Streptavidin - Biotin	Peroxidase	1:1	Zymed, San Francisco, USA

2.1.8 Primer

Die Primer wurden bei -20°C gelagert.

2.1.8.1 PCR - Primer

Die verwendeten PCR- Primer wurden von der Firma eurofins MWG (Ebersberg, D) bezogen.

Genotyp	Primernamen	5'-3'- Primersequenz	Fragmentgröße
K-ras	K-ras WT FW	GTC GAC AAG CTC ATG CGG GTG	500bp
	K-ras 006 WT REV	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA	
	K-ras Mutant FW	AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC	550bp
	K-ras 006 Mutant REV	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA	
P53	P53 WT FW	TTA CAC ATC CAG CCT CTG TGG	170bp
	P53 WT REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG	
	P53 Mutant FW	AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A	270bp
	P53 Mutant REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG	
Cre	Cre FW	CCT GGA AAA TGC TTG TGT CCG	400bp
	Cre Cre FW	CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC	

2.1.8.2 cDNA-Synthese Primer

Produkt	Hersteller
Oligo (dT) Primer (0,5g/l)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.9 Gebrauchsfertige Systeme

Die gebrauchsfertigen Systeme wurden nach Hersteller-Angaben verwendet. Das RNeasy- und das DNeasy- Kit wurden bei RT gelagert. Die mit * gekennzeichneten Produkte wurden bei +4°C, alle anderen bei -20°C gelagert.

Produkt	Hersteller
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
SYBR [®] GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Ready Mix Taq PCR Reaction Mix with MgCl ₂	Sigma, München, D
Vectastatin ABC Kit Peroxidase Rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA *
Vectastatin ABC Kit Peroxidase Goat IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA *
Vectastatin ABC Kit Peroxidase Guinea Pig IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA *

2.1.10 Sterilisation von Materialien

Alle Medien, die in einem sterilen Zustand verwendet wurden, wurden entweder mit einer Porengröße von 0,2µm steril filtriert, oder im Autoklav bei 120°C für 20 Minuten inaktiviert. Glas- und Plastikmaterialien wurden ebenfalls autoklaviert. Die Präparationsinstrumente zur Pankreasentnahme wurden mit Hilfe von Ethanol gereinigt und im Autoklav sterilisiert.

2.1.11 Software

Programm	Hersteller
Excel 2000	Microsoft, Redmond, USA
SPSS Statistics 15.0 for Windows	SPSS, Chicago, USA
Word 2003	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde zunächst die DNA aus den Mäuseschwanzbiopsien extrahiert. Im Lebensalter von 4 Wochen wurde die Schwanzspitze mit einer Schere abgesetzt, die 5 mm nicht überschreitet. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die DNA amplifiziert, gelelektrophoretisch getrennt und schließlich mit Hilfe von UV- Licht sichtbar gemacht.

2.2.1.1 DNA-Extraktion aus einer Mäuseschwanzbiopsie

Die DNA-Extraktion aus den Schwanzbiopsien der Mäuse erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen. Im ersten Schritt wurde das Gewebe lysiert. Dazu wurden 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase-K dazu gegeben und gut gemischt. Das Gewebe wurde im Heizblock bei 56°C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag folgte die Zugabe von 200µl AL-Puffer und das Vortexen der Proben. Nach der Zugabe von 200µl 70% Ethanol und erneutem Vortexen wurde die Lösung auf die Zentrifugationssäule eines Spin Column aufgetragen und für 1 Min. mit 8000 rpm zentrifugiert. Die DNA blieb auf der Membran des Spin Column haften. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat wurde verworfen und die Zentrifugationssäule wurde in ein neues 2,0 ml Sammeltube gestellt. Zum Auswaschen von anderen Bestandteilen aus der Membran wurden zunächst 500µl AW1 Puffer und danach 500µl AW2 Puffer auf die Membran gegeben und die Proben wurden mit 8000 rpm bzw. 12000 rpm zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugieren wurde das Eluat verworfen. Zum Schluss wurde das Spin Column auf ein 1,5ml Tube gestellt. Auf die Membran wurden 200µl des 56°C warmen AE Puffers pipettiert und bei RT inkubiert. Nach dem Zentrifugieren über 1 Min. bei 8000 rpm entstand die

Eluat mit der DNA in dem Tube. Das Eluat wurde entweder sofort verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Standard-PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die spezifische DNA amplifiziert, die zur Genotypisierung zur Verfügung steht. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um die spezifische DNA mit dem Enzym DNA-Polymerase zu vervielfältigen.

Die Polymerase-Kettenreaktion selbst wurde 1985 von Kary Mullis erneut erfunden. Seine Absicht war es, ein neuartiges DNA-Syntheseverfahren zu entwickeln und die DNA durch die wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen mit Hilfe eines Enzyms namens DNA-Polymerase künstlich zu vervielfältigen. Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 12–50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Die folgenden Angaben sind als Richtwerte gedacht. Meist muss eine PCR auf die spezifische Reaktion hin optimiert werden. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten.

1. Strangtrennung (Denaturierung): Die doppelsträngige DNA wird zunächst auf 94–96°C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten. Dieser Schritt führt zur Denaturierung der DNA.

2. Anlagerung der beiden Primer (Annealing): Im zweiten Schritt wird die Lösung auf die bestimmte Temperatur abgekühlt, bei der sich der Primer optimal an die Zielsequenz des DNA-Einzelstrangs anlagern kann (Annealing). Die optimale Annealing- Temperatur, die für beide Primer aufeinander abgestimmt werden, liegt zwischen 50-72 °C.

3. DNA-Synthese (Elongation): Anschließend wird die Lösung auf 72°C erhitzt, die optimale Temperatur für Taq-DNA-Polymerase. Die Synthese erfolgte so lange, bis das Ende der Matrize erreicht wird oder bis die Temperatur in anschließenden Zyklen wieder auf die Denaturierungstemperatur angehoben wird. Übliche Thermocycler kühlen die Reaktionsansätze nach Vollendung aller Zyklen auf 4–8 °C, so dass eine PCR am Abend angesetzt werden kann und die Proben am Morgen darauf weiter verarbeitet werden können.

2.2.1.3 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR wurden 2 µl Maus-DNA, 10 µl Ready-Mix, jeweils 1 µl Primer for und REV und 6 µl destilliertes Wasser in 0.2 ml Tubes pipettiert, damit man das benötigte Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes erhielt. Als negative Kontrolle dienten das destillierte Wasser und WT-DNA. Als positive Kontrollen dienten die DNA von den transgenen Pdx-1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+} und LSL-Tpr53^{R172H/+} Mäusen. Der Reaktionsansatz wurde in den Thermocycler gestellt und mit dem optimalen Programm gestartet.

Zyklen	Temperatur	Dauer
35x	95°C	3,0 Min.
	94°C	0,5 Min.
	60°C	1,0 Min.
	72°C	0,5 Min.
1x	72°C	3,0 Min.

Tab.4 PCR – Programm für P53

Zyklen	Temperatur	Dauer
35x	95°C	3,0 Min.
	94°C	1,0 Min.
	60°C	2,0 Min.
	72°C	1,0 Min.
1x	72°C	3,0 Min.

Tab.5 PCR – Programm für K-ras

Zyklen	Temperatur	Dauer
35x	95°C	4,0 Min.
	95°C	0,5 Min.
	59°C	0,5 Min.
	72°C	0,5 Min.
1x	72°C	5,0 Min.

Tab.6 PCR – Programm für Cre

Substanz	Menge
Ready Mix (Taq PCR Reaction Mix)	10 µl
dH ₂ O	6 µl
Forward – Primer (20pmol/µl)	1 µl
Reverse – Primer (20pmol/µl)	1 µl
genomische DNA	2 µl

Tab.7 PCR – Reaktionsansatz pro Probe



Abb.11 Thermocycler

2.2.1.4 Herstellung eines Agarosegels

Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 3,4g Agarose und 170ml eines 10x verdünnten TBE- Puffers gemischt und in der Mikrowelle gekocht, bis eine homogene blasenfreie Flüssigkeit entstand. Anschließend wurden 15 μ l Ethidiumbromid dazu pipettiert. Zur gleichmäßigen Verteilung wurde das Gefäß langsam geschwenkt. Danach wurde das Gel in eine Gelkammer langsam gleichmäßig gegossen, damit keine Luftblase entstand. Nach 30 min. wurde das Gel fest und aus der Kammer entfernt. Die Löcher, die im Gel zurückbleiben werden Slots genannt. Das Gel muss vollständig mit TBE- Puffer bedeckt sein. Die Slots müssen an der negativen Elektrode der Kammer liegen.



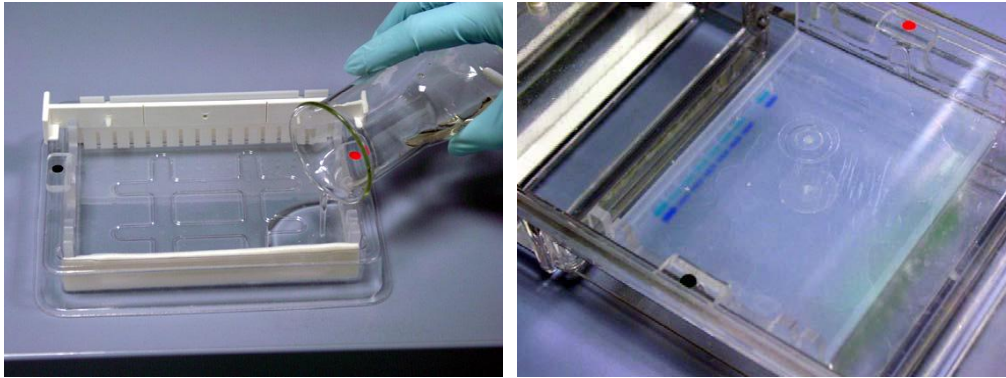


Abb.12 Herstellung von der Herstellung eines Agarosegels

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese und Auswertung der PCR

Zur Trennung und Analyse der amplifizierten DNA- Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und durch Einlagerung von Ethidiumbromid unter UV- Licht sichtbar (Sambrook et al., 1989). Durch Anlegen einer Spannung von 120V für 45 Min. erfolgte die Auftrennung der DNA- Fragmente im elektrischen Feld. Zur Dokumentation wurden die Banden durch eine über dem Transilluminator befindliche Kamera fotografiert. Mit Hilfe des Längenmarkers konnte die Größe der Banden kontrolliert werden.

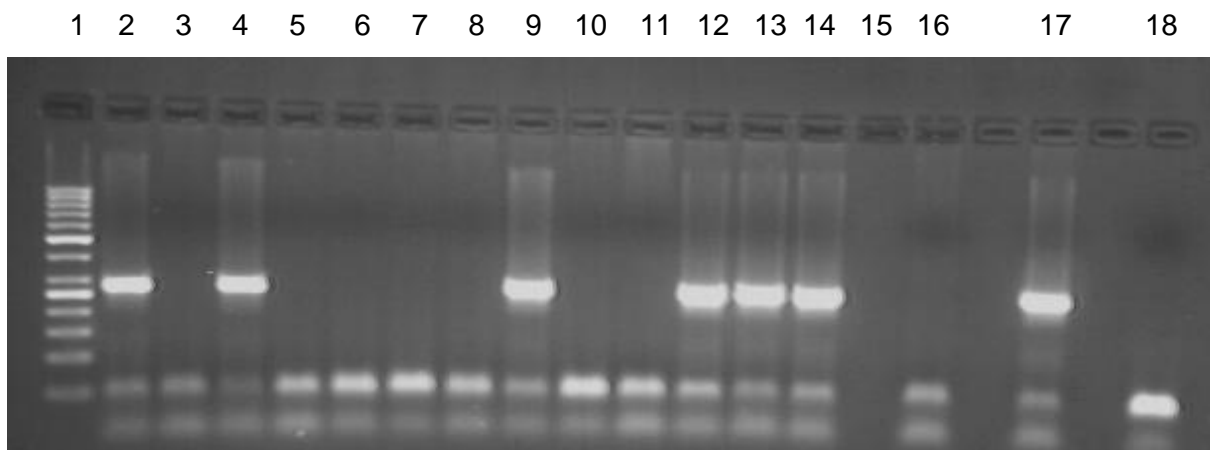


Abb.13 Beispiel eines analysierten Agarosegels (1 = Marker, 2-14 zu analysierende Proben (3, 5-8, 10-11 = negativ, 2, 4, 9, 12-14 = positiv), 16 = Wt, 17 = PK, 18 = H₂O)

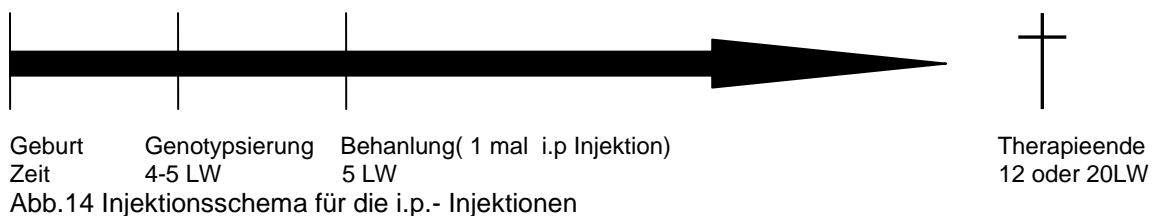
2.2.2 Haltung und Zucht der Tiere

Heterozygote LSL-Kras^{G12D/+} Mäuse werden mit heterozygoten LSL-Tpr53^{R172H/+} Mäusen gekreuzt. Hier ist zu erwarten, dass ca. 25% der Jungtiere doppelt transgen sind. Die transgenen LSL-Kras^{G12D/+} - LSL-Tpr53^{R172H/+} Mäuse werden dann mit den Pdx-1-Cre Mäusen gekreuzt. Hier wird ungefähr jedes achte Tiere drei fach transgen

sein. Die Mäuse werden in speziellen Käfigen im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrum der Universität Marburg bei einer Temperatur von 21 (± 1)°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 (± 5)% unter sterilen Bedingungen gehalten. Ein periodischer Tag- und Nacht- Rhythmus in zwölf Stunden Intervallen ist im Tierstall eingestellt. Die Fütterung erfolgte mit Standardzuchtfutter und Wasser (pH 3,0) ad libitum. In jedem Käfig wurde ein transgenes Männchen und 2 transgene Weibchen zusammengesetzt. Ab 3 Wochen nach der Geburt wurden die Jungtiere dem Geschlecht nach auf neue Käfige verteilt und gleichzeitig mit einem Ohrclip mit fortlaufenden Nummern markiert.

2.2.3 Versuchsplan und Ablauf der intraperitonealen Injektionen

Aufgrund der antitumoralen Eigenschaften von Enalapril soll eine chemopräventative Wirkung beim Pankreaskarzinom am Pdx-1-Cre- LSL-Kras^{G12D/+} - LSL-Tpr53^{R172H/+} Mäusen untersucht werden. Nach Sakamoto et al. wurde die Enalapril-Dosierung mit 0.6mg/kg/täglich in der Behandlungsgruppen festgelegt. Mit Beginn der 5. Lebenswoche wird die Behandlung der transgenen Tiere mit Enalapril begonnen. Die intraperitoneale Injektion der Tiere erfolgte 1 mal pro Tag. Vor jeder Injektion wurde der Injektionsberich desinfiziert. Die Applikation erfolgte unter sterilen Bedingungen mit einem maximalen Volumen von 0.2 ml. Die Dauer der Applikation beträgt je nach individueller Behandlungsgruppe zwischen 12 und 20 Monate. Jede Versuchsgruppe von 10 Mäusen wurde bis zum Tötungszeitpunkt mit Medikamenten behandelt und einer Kontrollgruppe von 10 Mäusen gegenüber gestellt.



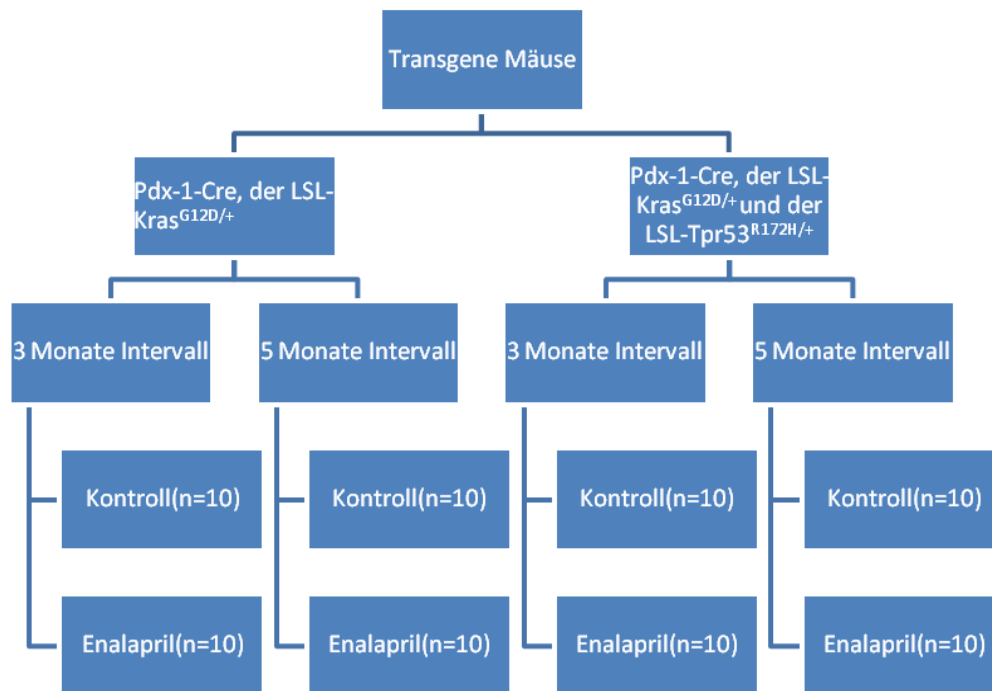


Abb.15 Versuchsplan von Pdx-1-Cre, der LSL-Kras^{G12D/+} und der LSL-Tpr53^{R172H/+} Mäusen

2.2.4 Tötungszeitpunkte der Gruppen und Entnahme der Organe

Da die Behandlung der Tiere ab der 5 Lebenswoche beginnen soll, liegen die Tötungszeitpunkte am Ende der 12. und 20. Lebenswoche. Hingorani et. al beschreiben, dass es bei den transgenen Mäusen zur Entwicklung von Aszites kommt, der am geblähten und aufgetriebenen Abdomen zu erkennen ist. Vom ersten auftreten des Aszites bis zum Tod der Tiere, der durch zervikale Dislokation herbeigeführt wurde, lagen 48-72 Stunden. Nach dem Eintritt des Todes wurden die äußerlichen Auffälligkeiten der Mäuse beschrieben. Vor dem Öffnen des Bauchraums wurden die Mäuse fotografiert. Danach wurde die Mittellinie mit einer Schere geöffnet und das Pankreas wurde sicher dargestellt und fotografiert. Anschließend wurde das Pankreasgewebe der Mäuse entnommen und gewogen. Für die weitere Verarbeitung wurde das Pankreas geteilt, wobei die eine Hälfte für die Einbettung in Paraffin, die andere für die RNA - Extraktion bestimmt war.

2.2.5 Histologische Untersuchung des Gewebes

Das Gewebe wurde nach standardisierter Methode in Paraffinblöcke eingebettet. Davon wurden mindestens 10 4 µm dicke Serienschnitte pro Maus angefertigt. Um den Effekt der Chemoprävention der Medikamente bewerten zu können, ist die korrekte histologische Beurteilung des entnommenen Pankreasgewebes von

Bedeutung. Entsprechend der Erstbeschreibung des Pdx-1-Cre-LSL-Kras^{G12D/+}-LSL-Tpr53^{R172H/+}-Mausmodells wurde die Gesamtzahl der PanINs und ihr spezifischer Grad jeder Maus, nach der Klassifikation von PanINs des Pankreas (Tabelle 3) bestimmt. Desweiteren wurden invasive Pankreaskarzinome und auftretende Metastasen erfasst.

Grad mPanIN	Histologie
IA	muzinöse Zellhypertrophie, auch mukoide Transformation oder Becherzellmetaplasie genannt. Ersatz des Gangepithels durch Becherzellen mit intrazytoplasmatischer Schleimansammlung und basal liegenden Zellkernen.
IB	Die Läsionen haben einen papillären oder pseudopapillären Aufbau und ähneln den Epithelien der Kategorie PanIN-1A. Es handelt sich hierbei um fokale fibrovaskulär gestielte Hyperplasien von muzinös differenzierten Gangepithelien, die die mittleren und großen Gallengänge betreffen.
2	Die Gangstrukturen besitzen ein flaches oder papillär-hyperplastisches Epithel, das zelluläre Atypien aufweist. Nukleäre Veränderungen, wie Kernhyperchromasie oder Polaritätsverlust kategorisieren eine Läsion, die man als atypische duktale Hyperplasie bezeichnet.
3	Die Läsionen zeigen ausgeprägtere nukleäre und zelluläre Atypien, histologisch kennzeichnet sie ein papilläres, teilweise kribiform imponierendes Epithel. Mitosen, Nekrosen und zelluläre Atypien kommen vor.

Tabelle 7. Klassifikation der mPanINs (35)

2.2.6 Färbung

2.2.6.1 Hämalun – Eosin - Färbung von Paraffinschnitten

Die Objektträger mit dem paraffinierten Gewebe wurden 2 mal in Xylol für jeweils 5 min. entparaffiniert und rehydriert. Danach wurden die Objektträger in einer absteigenden Ethanolreihe 100%, 85%, 70%, 50% für jeweils 2 min. dehydriert und im Anschluss 2 mal für 2 min. in ddH₂O gestellt. Die Objektträger wurden mit Hämalun nach Mayer für 5 min. gefärbt und im fließenden, lauwarmen Wasser für 10 min. entfärbt. Danach wurden die Objektträger für 30 sek. mit 0,5%- igem Eosin gegengefärbt und 2 mal in ddH₂O kurz gespült, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Objektträger wurden in einer aufsteigende Alkoholreihe Ethanol 50% für 1 min., Ethanol 70% für 1 min., Ethanol 85% für 2 min. und Ethanol 100% für 5

min. dehydriert und im Anschluss 2 mal für 5 min. in Xylol gestellt. Zum Schluss wurde das Gewebe eingedeckelt.

2.2.6.2 Immunhistochemische Färbungen

Als Immunhistochemie wird in der Biologie und Medizin eine Methode bezeichnet, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Mithilfe von Antikörpern lässt sich bestimmen, in welchem Gewebe das Protein vorhanden ist und in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist. Beispielsweise können Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern lokalisiert sind, nur im Zellkern angefärbt werden, membranständige Proteine nur in Teilen der Zellmembran. In der medizinischen Histologie dient die Immunhistochemie in der Regel der Identifikation und Klassifizierung von Tumorzellen, die bestimmten Antigene exprimieren. So können morphologisch gleich erscheinende Tumore, die sich aber in ihrem Wachstums- oder Absiedelungsverhalten (Aggressivität, Metastasen) oder in ihrer Therapieantwort unterscheiden, zugeordnet werden.

2.2.6.2.1 Indirekte Methode

Mithilfe von Antikörpern lässt sich auch ein bestimmtes Protein in der Zelle sichtbar machen. Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden entwacht und dehydriert. Fixierte Gewebeschnitte wurden in einer Citratpufferlösung (pH 6) für 10 Minuten in der Mikrowelle knapp unterhalb des Siedepunktes erhitzt und anschließend 20 Minuten abgekühlt. Dadurch wurden die Quervernetzungen des Fixativs wieder gelöst. Nach diesem Permeabilisierungsschritt kann der primäre Antikörper das Antigen in der Probe binden. Das Nachweissystem ist an den sekundären Antikörper gekoppelt. Dieser bindet an den Komplex aus primärem Antikörper und Antigen, und schließlich gibt man die entsprechenden Reagenzien hinzu, um den Komplex sichtbar zu machen und zu lokalisieren.

2.2.6.2.2 Prozess der immunhistochemischen Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung wurde die Avidin- Biotin- Complex-Methode (ABC-Methode) nach Hsu et al. durchgeführt (Hsu et al., 1981). Sie beinhaltet 3 spezifische Komponenten: den Primärantikörper, den biotinylierten Sekundärantikörper und den Avidin- Biotin- Peroxidase- Komplex. Die Objektträger mit dem paraffinierten Gewebe wurden 2 mal in Xylol für jeweils 5 min. entparaffiniert und rehydriert. Danach wurden die Objektträger in einer absteigenden Ethanolreihe

100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% für jeweils 2 min. dehydriert und im Anschluss 2 mal für 2 min. in ddH₂O gestellt. Zur Demaskierung wurden die Objektträger in Citratpuffer(pH6.0) für 10 min. unter dem Siedepunkt in der Mikrowelle erhitzt. Danach wurden die Objektträger auf Eis für 20 min. abgekühlt. Die Objektträger wurden 3-mal für jeweils 5 min. in dH₂O gespült. Die Deaktivierung der endogenen Peroxidase des Gewebes erfolgte mit einer Inkubation der Objektträger in 3 %-igem Wasserstoffperoxid(H₂O₂) für 10 min. bei RT. Das Gewebe auf dem Objektträger wurde mit einem spezifischen Stift markiert und in eine feuchte Kammer umgesetzt. Durch die Spülung mit PBST wurde die Oberflächenspannung auf den Objektträgern reduziert. Danach wurden die Objektträger in 10%igem BSA für 60 min. inkubiert. Nach mehrmaligen Spülungen wurde der primäre Antikörper in der optimalen Konzentration aufgetragen und die Objektträger wieder in die feuchte Kammer umgesetzt um über Nacht bei 4°C zu inkubieren. Am zweiten Tag wurden die Objektträger 3-mal für jeweils 5 min. mit PBST gespült, damit der primäre Antikörper sicher entfernt wurde. Danach wurde der sekundäre Antikörper auf den Objektträger aufgetragen und für 60 min. inkubiert. Wieder wurde der sekundäre Antikörper entfernt. In nächsten Schritt wurde das angefertigte ABC-Kit auf den Objektträgern aufgetragen und für 60 min. inkubiert. Nachdem das ABC-Kit entfernt wurde, wurden die Objektträger 3-mal mit PBST für 5 min. gespült. Unter dem Mikroskop wurden die Objektträger mit DAB-Chromogen gefärbt. Die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen wurden sichtbar, indem sich markierte Stellen im Gewebe rotbraun darstellten. Bei optimaler Braunfärbung wurde DAB-Chromogen mit ddH₂O gespült und die Reaktion von DAB-Chromogen dadurch gestoppt. Das Gewebe wurde mit Hämalun für 15 Sek. gegen gefärbt und die Objektträger wurden im fließenden, lauwarmen Wasser für 10 min. entfärbt und danach 2-mal in ddH₂O gespült, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100 für jeweils 2 min. dehydriert und im Anschluss 2 mal für 5 min. in Xylol gestellt. Zum Schluss wurde das Gewebe mit Depex eingedeckelt.

2.2.6.3 RNA-Extraktion

Nach Angaben des Herstellers erfolgte die RNA- Extraktion mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Vor der RNA-Extraktion wurde das Pankreasgewebe zuerst mit Hilfe eines handelsüblichen Homogenisators homogenisiert. Für eine maximale Ausbeute

an RNA ist die vollständige Homogenisierung der Gewebeprobe sehr wichtig. Zu dem homogenisierten Gewebe wurden dann 500µl Trizol pipettiert und für 5 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde die Lösung gut durchgemischt, bis eine milchige Lösung entstand. Die Tubes wurden 5 min. bei RT inkubiert und in eine Thermozentrifuge umgesetzt. Anschließend wurden die Tubes bei 4°C mit 12.000 rpm. für 15 Min. zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden 350µl der klaren Flüssigkeit von der Oberschicht in neue Tubes pipettiert. Dazu wurde das gleiche Volumen von 70% Ethanol gegeben und mit der Pipette gut durchgemischt. Die gesamte Lösung von 700µl wurde auf die Zentrifugationssäule eines RNeasy Spin Columns übertragen und für 15 Sek. mit 10.000 rpm zentrifugiert. Das 2,0 ml Sammeltube mit dem Filtrat wurde verworfen und die Zentrifugationssäule wurde in ein neues 2,0 ml Sammeltube gestellt. Nach Zugabe von 700µl RM1- Puffer wurde die Zentrifugationssäule für 15 Sek. mit 10.000 rpm zentrifugiert und das 2,0 ml Sammeltube wurde gewechselt. Anschließend wurde die Zentrifugationssäule nach Zugabe von 500µl RPE- Puffer wieder für 2 Min. mit 10.000 rpm zentrifugiert. Zum Schluß wurde die Zentrifugationssäule auf ein 1.5 ml Sammeltube gestellt. Nach Zugabe von 40µl RNase freiem H₂O wurde die Zentrifugationssäule für 1 min. inkubiert und dann für 1 min. mit 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat enthält die gereinigte RNA.



Abb.16 handelsüblichen Homogenisator

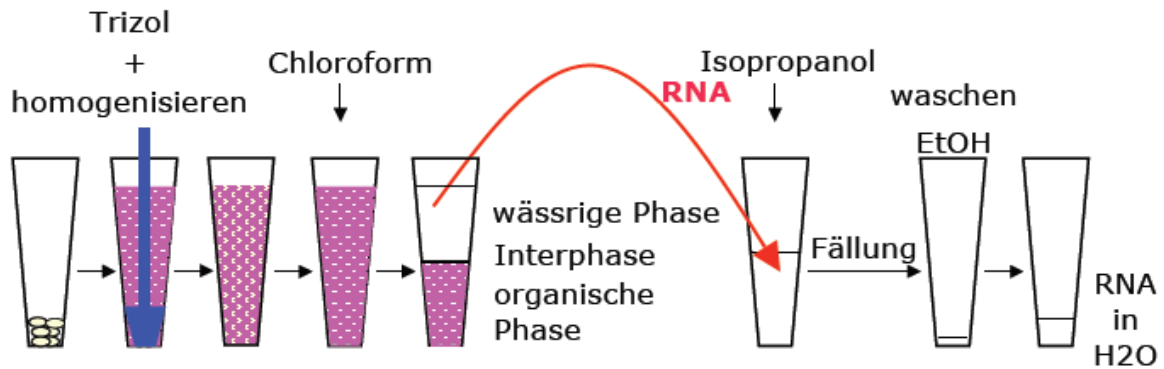


Abb.17 Procedere von der Herstellung eines Agarosegels

2.2.7 Herstellung von cDNA und real time RT-PCR

Vor der Herstellung von cDNA wurde die Konzentration von RNA bestimmt, die mit Hilfe eines UV – Spektrometers auf Basis des Lambert - Beer'schen - Gesetztes bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280nm gemessen wurde. Die cDNA ist eine DNA-Kopie von einer Messenger-RNA(mRNA) die mit Hilfe des Enzyms Reverse Transcriptase hergestellt wurde. Setzt man alle mRNA-Moleküle einer Zelle um, so erhält man eine Sammlung von cDNA-Molekülen, welche allen aktiven Genen entsprechen. Die synthetisierte cDNA kann dann mittels RT- PCR amplifiziert und quantitativ gemessen werden. Zur Synthese von cDNA wurden 3µg RNA in ein 1,5ml Tube auf Eis vorgelegt und folgender Reaktionsansatz zugegeben:

Substanz	Menge
Oligo dT DNA (12 – 18 Basenpaare)	1 µl
dNTP Mix (10mM)	1 µl
dH ₂ O	ad 13 µl

Tab.8 cDNA-Synthese Ansatz

Nach Zugabe von Reaktionsansatz wurde die Lösung gut gemischt und bei 65°C im Heizblock für 5 min. inkubiert. Danach wurde das Tube für 1 min. auf Eis abgekühlt und kurz bei 4.000 rpm zentrifugiert.

Folgende Substanzen wurden zugegeben:

Substanz	Menge
First Strand Buffer (5 x)	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
RNase Out	1 µl
Super Script III Reverse Transkriptase (200 units/ µl)	1,5 µl

Tab.9 cDNA-Synthese Ansatz

Nach Zugabe von folgenden Substanzen wurde die Lösung gut gemischt und bei 50°C im Heizblock für 60 min. inkubiert. Danach wurde das Tube kurz bei 4.000 rpm zentrifugiert. Nach 60 min. wird die Reaktion durch Inkubation bei 70°C für 15 min. gestoppt. Die cDNA-Synthese ist damit abgeschlossen und die cDNA steht für die RT-PCR zur Verfügung. Am besten wird die cDNA sofort in der RT-PCR eingesetzt. Sie kann aber auch bei 80° C für mehrere Monate gelagert werden.

2.2.8 Statistik

Entsprechend der Erstbeschreibung des Pdx-1-Cre-LSL-Kras^{G12D/+}-LSL-Tpr53^{R172H/+}-Mausmodelles wurde die Gesamtzahl der PanINs und ihr spezifischer Grad jeder Maus bestimmt, und nach der Klassifikation von PanINs des Pankreas eingeteilt (Tabelle 3). Desweiteren erfolgte die Erfassung invasiv wachsender Pankreaskarzinome und eventuell auftretender Metastasen anhand der beim Menschen üblicher Klassifikationen (34). Nach Auswertung und Durchsicht aller Pankreata der Kontroll- und Behandlungsgruppen werden die Daten mit den Programmen Microsoft Excel (Version 2003) und SPSS (Version 15.0) ähnlich wie in Abbildung 18 dargestellt. Die Signifikanztestung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde mit dem t- Test und dem Levene- Test durchgeführt. Die graphische Auswertung der Überlebenskurven basiert auf der Methode nach Kaplan-Meier.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

Nicht signifikant entspricht $p > 0,05$

Signifikant entspricht $p < 0,05$

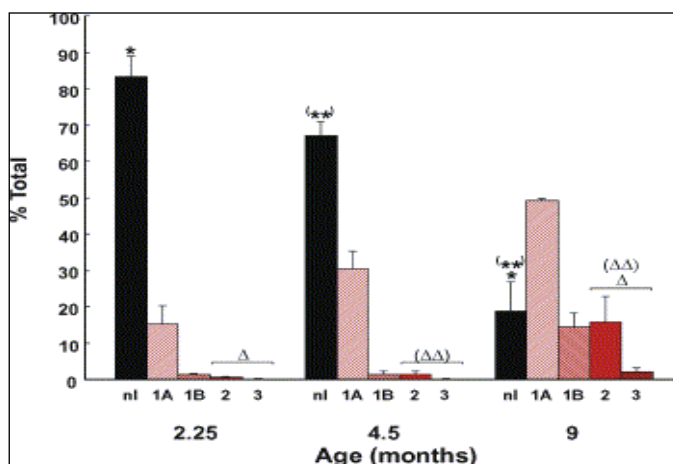


Abb.18 Gesamtzahl der PanINs des Pankreasgewebes

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung von PanINs und Pankreaskarzinom bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+} und Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+} Mäusen

Die Expression des mutierten Allels wird dadurch erreicht, dass die LSL-Kras^{G12D}-Mäuse mit Mäusen gekreuzt werden, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pdx1-Promoters exprimieren. Dies führt zum Herausschneiden des LSL-Elements und zur Expression der onkogenen Form des K-ras Proteins (30). Im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe entwickeln Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+} Mäuse niedriggradige PanINs (Abb. 19 A, B) und hochgradige PanINs (Abb. 19C und Abb. 20). Bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+} Mäusen entwickelten sich invasive Pankreaskarzinome (Abb. 19D).

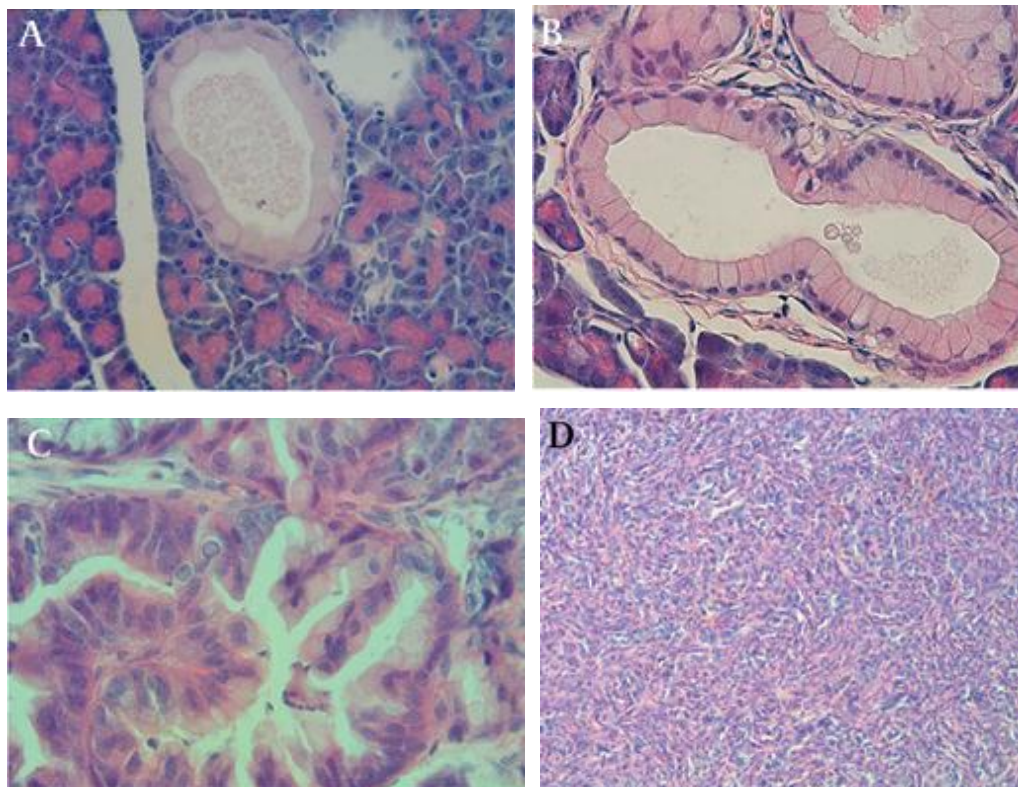


Abb.19 (A) PanIN-1A (B) PanIN-1A (C) PanIN-3 von Maus mit LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre in der 3 Monate-Gruppe(D) invasives Pankreaskarzinom von Maus mit LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre in der 5 Monate-Gruppe

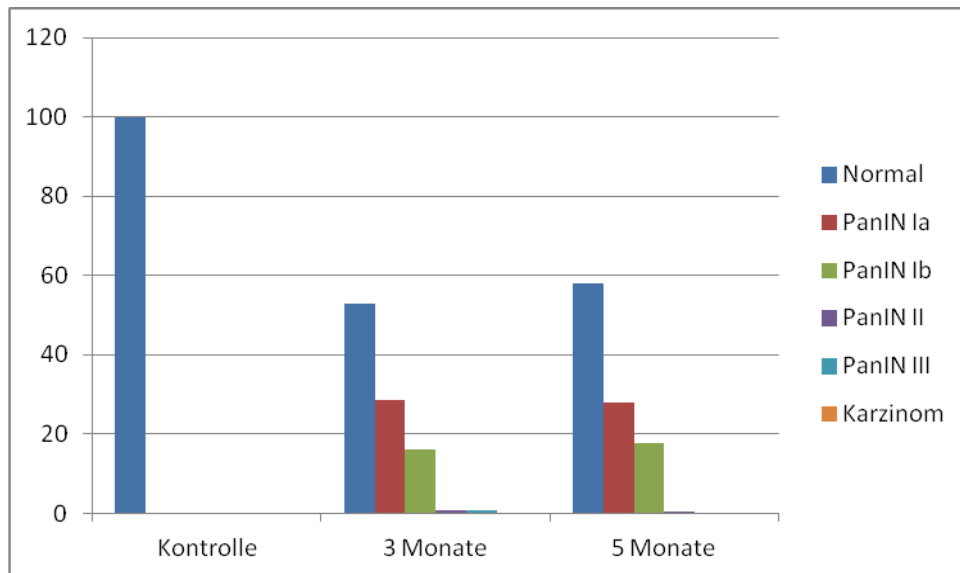
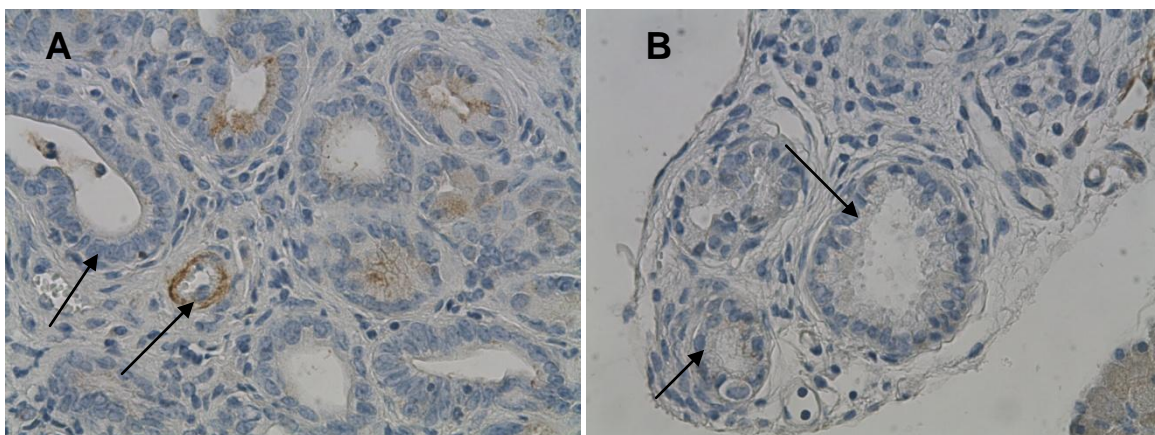


Abb.20 Gesamtzahlen und PanIN- Grade der Mäuse mit LSL-Kras^{G12D/+}; Pdx-1-Cre

3.2 Überexpression von AT1-Rezeptor in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen und LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre-Mäusen

Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte erstmals nachweisen, dass Angiotensin II die mRNA-Expression von VEGF in endothelialen Zellen des duktales Adenokarzinom des Pankreas induziert (6). Zur Bestätigung dieser Aussage wurde die immunhistochemische Färbung mit einem primären AT1-Rezeptor-Antikörper durchgeführt. Die Expression von AT1-Rezeptoren konnte im normalen Pankreas nur in Gefäßwand nachgewiesen werden (Abb. 21 A). Bei niedriggradigen PanINs war eine Expression des AT1-Rezeptors nur schwach nachzuweisen (Abb. 21B). Dagegen konnte in PanIN 2 und im Pankreaskarzinom eine deutliche Expression nachgewiesen werden. (Abb 21C,D).



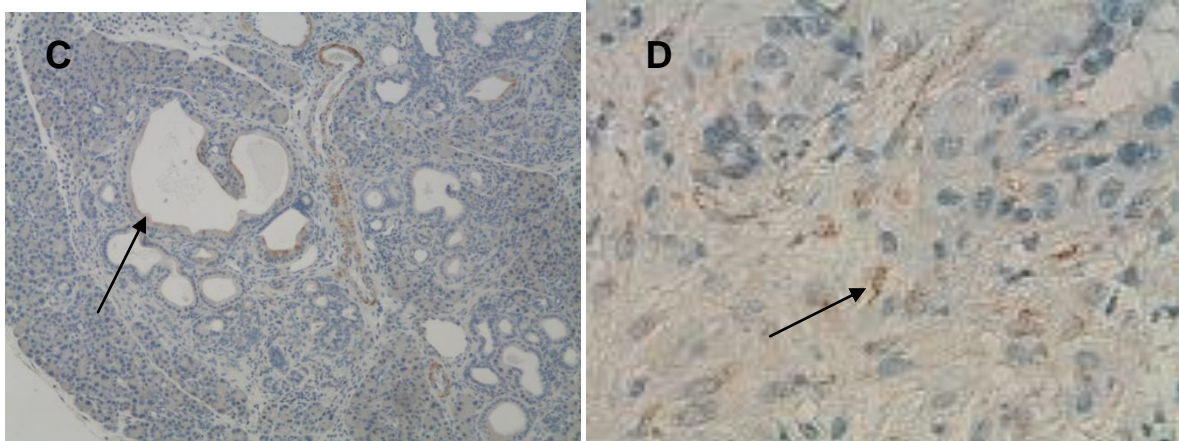


Abb.21 Expression des AT1-Rezeptor (A) normales Pankreasgewebe (B) PanIN 1A (B) PanIN 2 (C) Pankreaskarzinom (D)

3.3 Überexpression von NF- κ B in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen und Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen

NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivierung antiapoptotischer und inflammatorischer Signalwege und reguliert die Regression von vielen Genen, die beim Zellwachstum, der Zellproliferation, der Apoptose und der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle spielen. Bei einer Studie zeigte sich eine erhöhte Aktivität von NF- κ B in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien und in resezierten Pankreaskarzinomen (8-9). Nach dem Nachweis der Überexpression von AT1-Rezeptoren wurde die Expression von NF- κ B im Pankreaskarzinom und PanINs evaluiert. Das Ergebnis zeigte, dass im normalen Pankreasgewebe keine Expression von NF- κ B auftrat (Sternzeichen in Abb. 22A-C). Im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe wurde die Überexpression von NF- κ B im metaplastischen Gewebe (Abb. 22A,B), PanINs (Abb. 22C), und Pankreaskarzinom nachgewiesen (Abb. 22D). Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer Enalapril als wirksame Chemoprävention wirken könnten. Im Pdx-1-Cre; Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+} Mausmodell bietet sich die Möglichkeit, die Auswirkungen einer Chemoprävention mit Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer Enalapril auf die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms zu untersuchen.

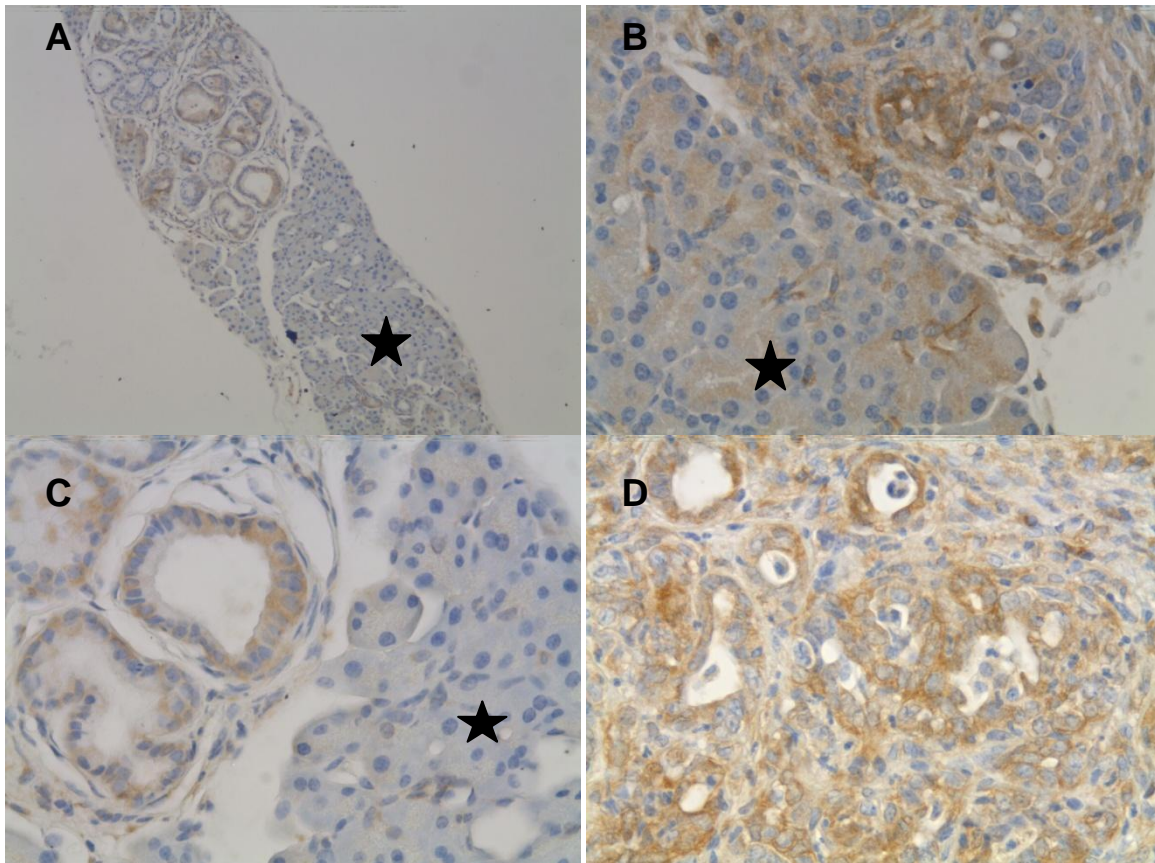


Abb. 22 NF-κB-Expression (A-D) normales Pankreasgewebe mit metsplastischem Gewebe (B) PanIN 1A (C) Pankreaskarzinom (D)

3.4 Wirkung von Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer Enalapril auf die Entwicklung von PanINs in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen

In der Behandlungssgruppe zeigte sich nach 3 und 5 Monaten folgendes Ergebnis. Enalapril verzögerte die Progression von PanINs in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen signifikant. Nach 3 Monaten waren in der Kontrollgruppe 53% der Pankreasgänge normal,, 28.6% zeigten Veränderungen im Sinne von PanIN Ia, zu 16% PanIN Ib, zu 0.6% PanIN II, und zu 0.6% als PanIN III- Läsionen. In der Behandlungsgruppe mit Enalapril waren nach 3 Monaten 73.9% der Pankreasgänge unverändert ($p=0.046$), 14.9% wurden als PanIN Ia Läsionen klassifiziert ($p=0.01$), 10.5% PanIN Ib ($p=0.74$), zu 0.5% PanIN II ($p>0.05$), und überhaupt keine PanIN III- Läsionen. Nach 5 Monaten zeigte sich in der Kontrollgruppe zu 58% normales Pankreasgänge, zu 28% PanIN Ia, zu 17.6% PanIN Ib, zu 0.4% PanIN II und keine PanIN III- Läsionen. Im Vergleich dazu wurde in der Behandlungsgruppe mit Enalapril zu 58% normales Pankreasgewebe ($p=0.001$), zu 15.2% PanIN Ia ($p=0.001$), zu 10.5% PanIN Ib ($p=0.03$), und keine höhergradigen PanINs gefunden.

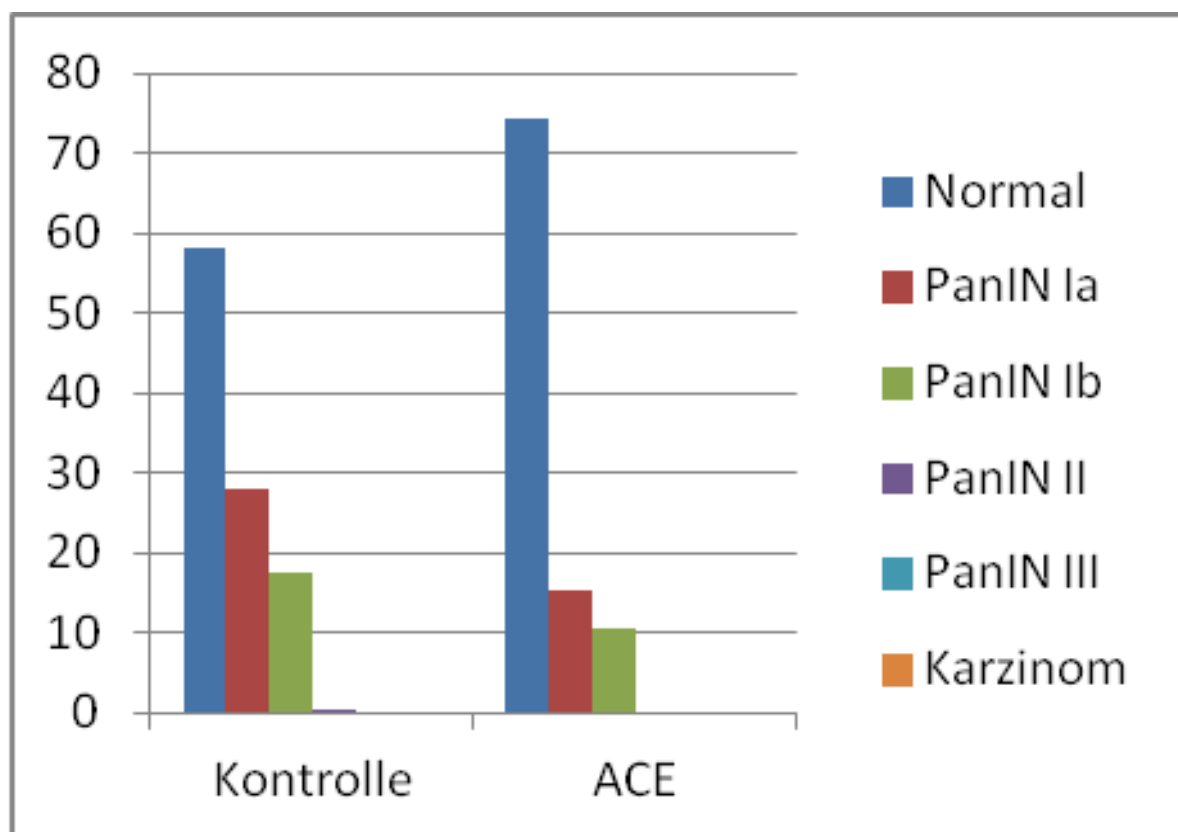
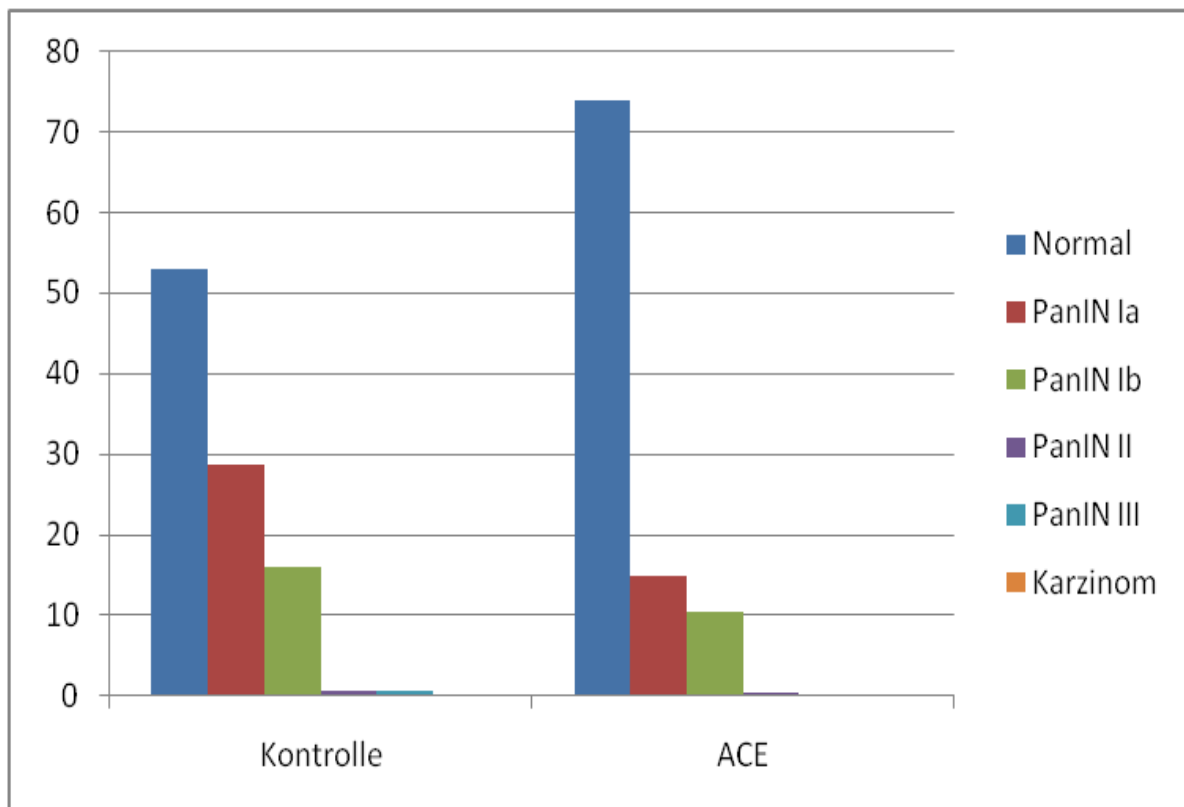


Abb.23 Enalapril verzögern die Progression von PanINs der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+} Mäuse (A) 3 Monate im Behandlungsgruppe (B) 5 Monate im Behandlungsgruppe

3.5 Entwicklung eines invasiven Pankreaskarzinoms von Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen und deren partielle Verhinderung durch Enalapril

Nach 3 und 5 Monaten wurden alle lebenden Mäuse der Behandlungsgruppe getötet. Der Bauch wurde eröffnet und das Pankreas reseziert (Abb. 24). 60% der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse (15 von 25) der Kontrollgruppe entwickelten ein invasives Pankreaskarzinom (Abb. 24A). Im Vergleich dazu wurde bei 23.5% der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse (4 von 17, $p=0.03$) in der Behandlungsgruppe mit Enalapril ein invasives Pankreaskarzinom festgestellt. (Abb. 25). Es wurden keinerlei Metastasen sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe festgestellt.

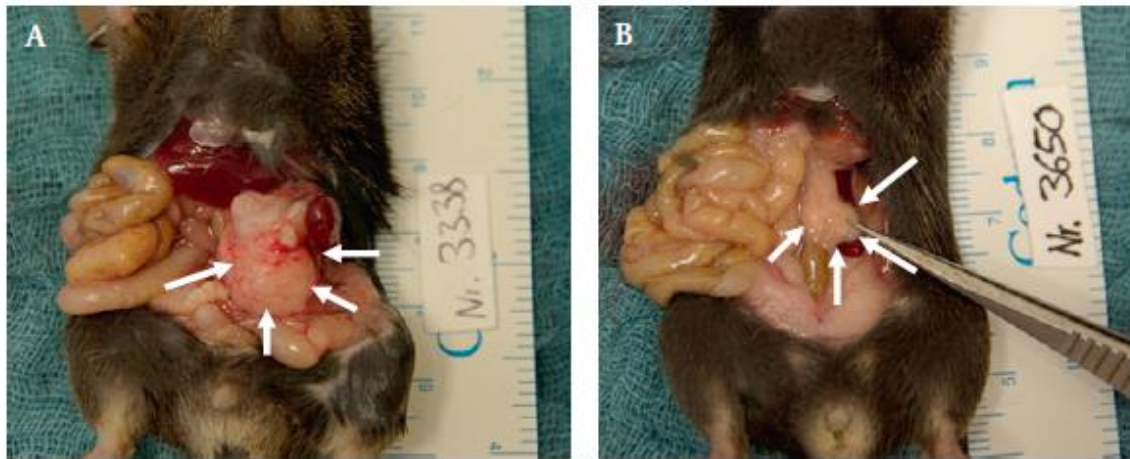


Abb. 24 Darstellung eines Pankreaskarzinoms (A) Mehr als 50% der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse entwickelten ein invasives Pankreaskarzinom. (B) In den Behandlungsgruppen mit Enalapril fanden sich nach 3 und 5 Monaten kleinere Karzinome.

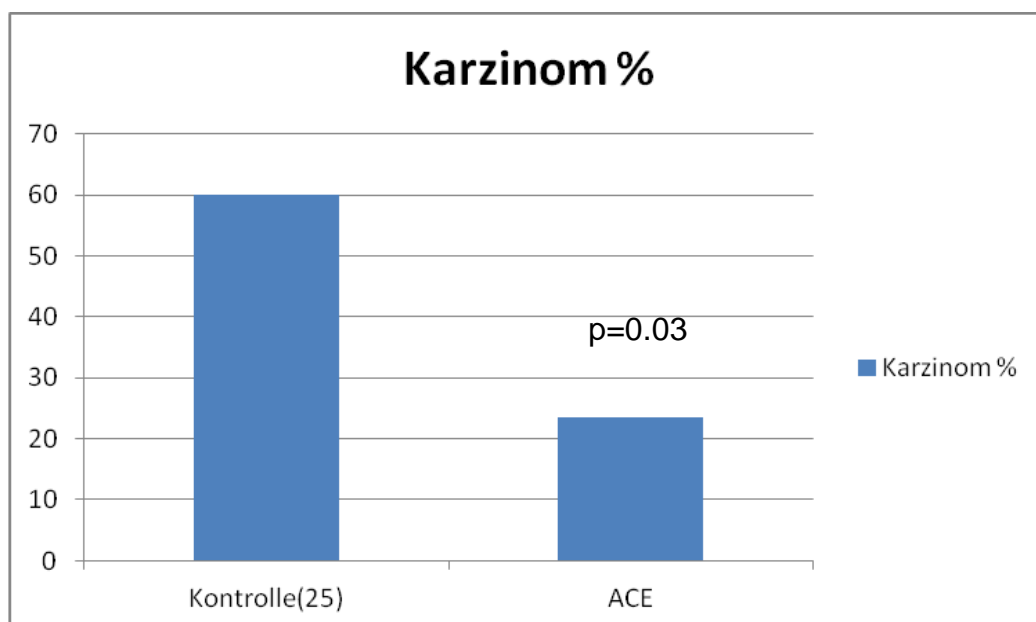
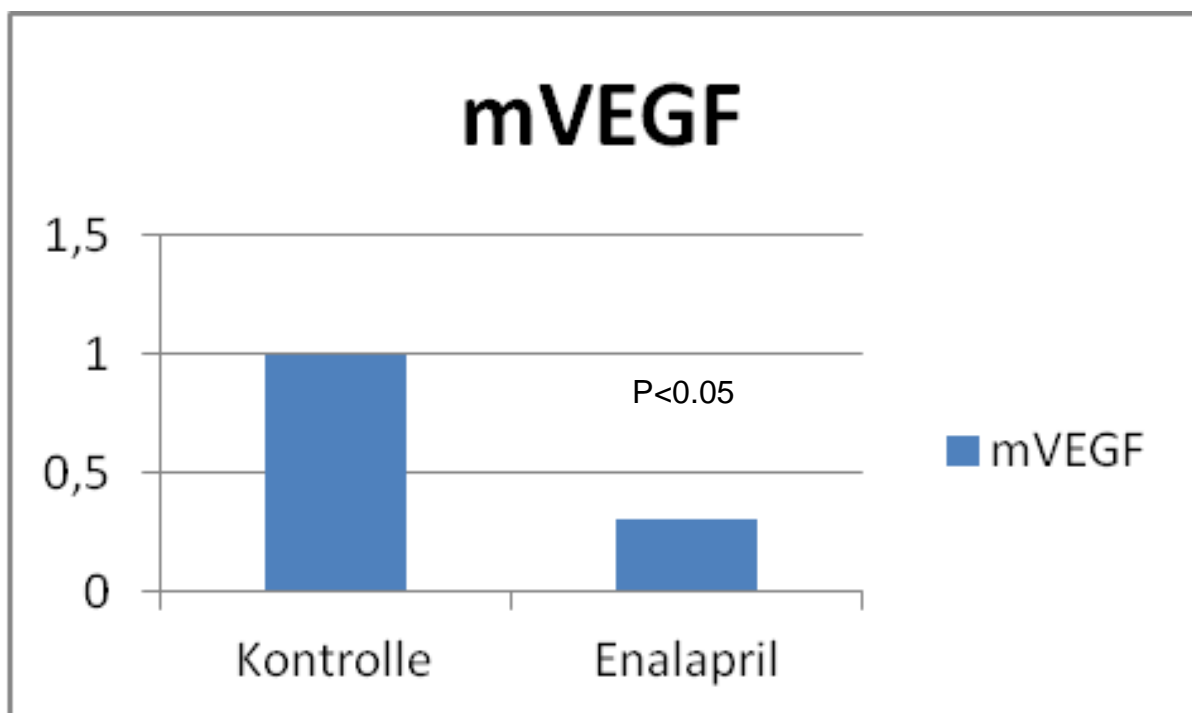


Abb.25 Die Progression des invasiven Pankreaskarzinoms wurde in der Behandlungsgruppe mit Enalapril signifikant festgestellt.

3.6 Gene für VEGF und NF- κ B im invasiven Pankreaskarzinom wurden durch Enalapril unterreguliert.

Die klinische und histopathologische Studie hatte nachgewiesen, dass Enalapril die Entwicklung von Pankreaskarzinomen verhindert. Als nächster Schritt wurden die Gene des Tumorgewebes, die durch Enalapril herunter reguliert wurden, untersucht. Beim Pankreaskarzinom erfolgte eine Überexpression von VEGF und Angiotensin II, die die mRNA-Expression von VEGF in endothelialen Zellen und im duktaalen Adenokarzinom des Pankreas induzieren (6). Es ist auch bekannt, dass Enalapril die VEGF herunter regulieren kann (6). Der Transkriptionsfaktor p65 ist ein Protein, das beim Menschen durch das RelA-gen codiert ist. Die p50 (NFKB1) / p65 Heterodimer (RelA) ist die häufigste Komplexform der NF- κ B. Durch die Untersuchung von RelA wurde festgestellt, wie stark Enalapril die NF- κ B runter reguliert. Mit der real time PCR wurden die beiden Gene des Pankreaskarzinoms von Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen in der Behandlungsgruppe mit Enalapril reguliert (Abb. 26). Die real time PCR hatte bestätigt, dass die effektiven Pharmakologischen Auswirkungen von Enalapril auf die Entwicklung des Pankreaskarzinoms im Mausmodell folgten.



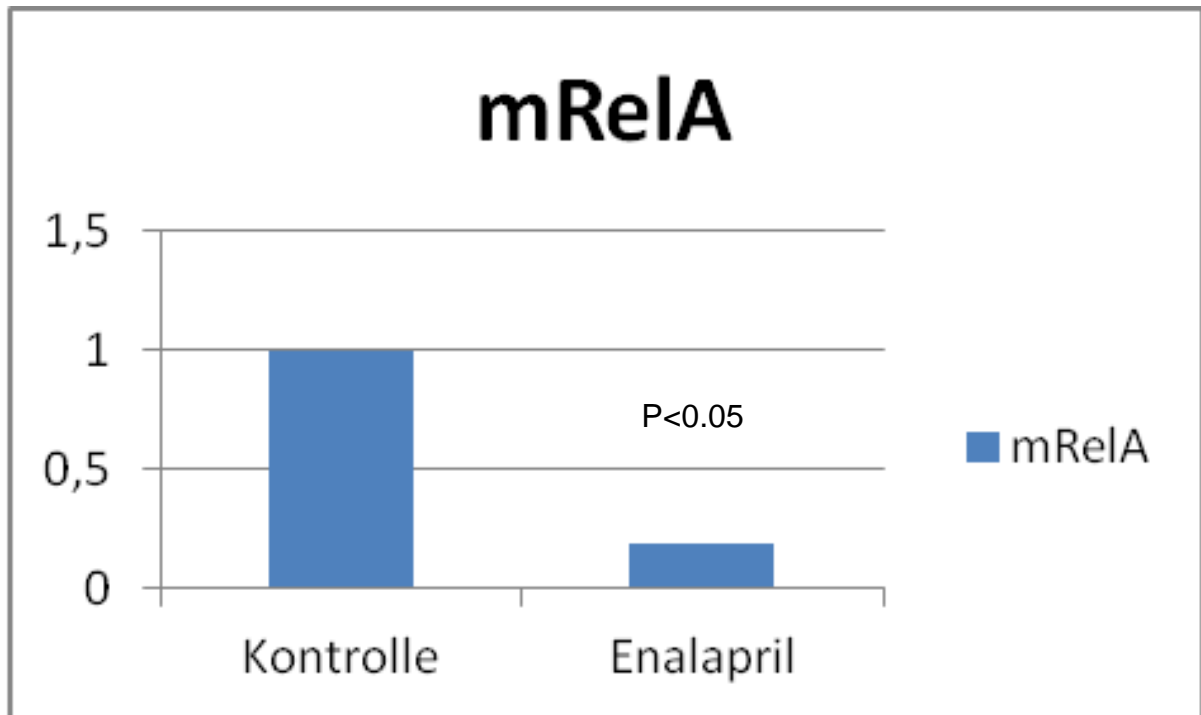


Abb. 26 Die Gene für VEGF und NF- κ B im Pankreaskarzinom wurden durch Enalapril mit real time PCR runter reguliert.

3.7 Überexpression der Amylase in PanINs und Pankreaskarzinom von Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen

Eine Studie zeigte, dass bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen sich die mPanINs und eine exokrine Überexpression der Amylase in Azinus- und Zentroazinuszellen entwickelten, die in der Richtung Pankreasneoplasie induziert wurden (27). Deswegen wurde die Amylase der Azinuszellen und mPanINs von Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen untersucht. Am metaplastischen Epithel wurde eine Überexpression der Amylase an Azinuszellen festgestellt (Abb. 27). In niedrigen Graden der mPanINs-Läsionen und immunhistochemischen Färbung zeigte sich, dass eine Überexpression der Amylase an einzelnen Zellen auftrat und es eine phenotypische exokrine Differenzierung bestätigt.

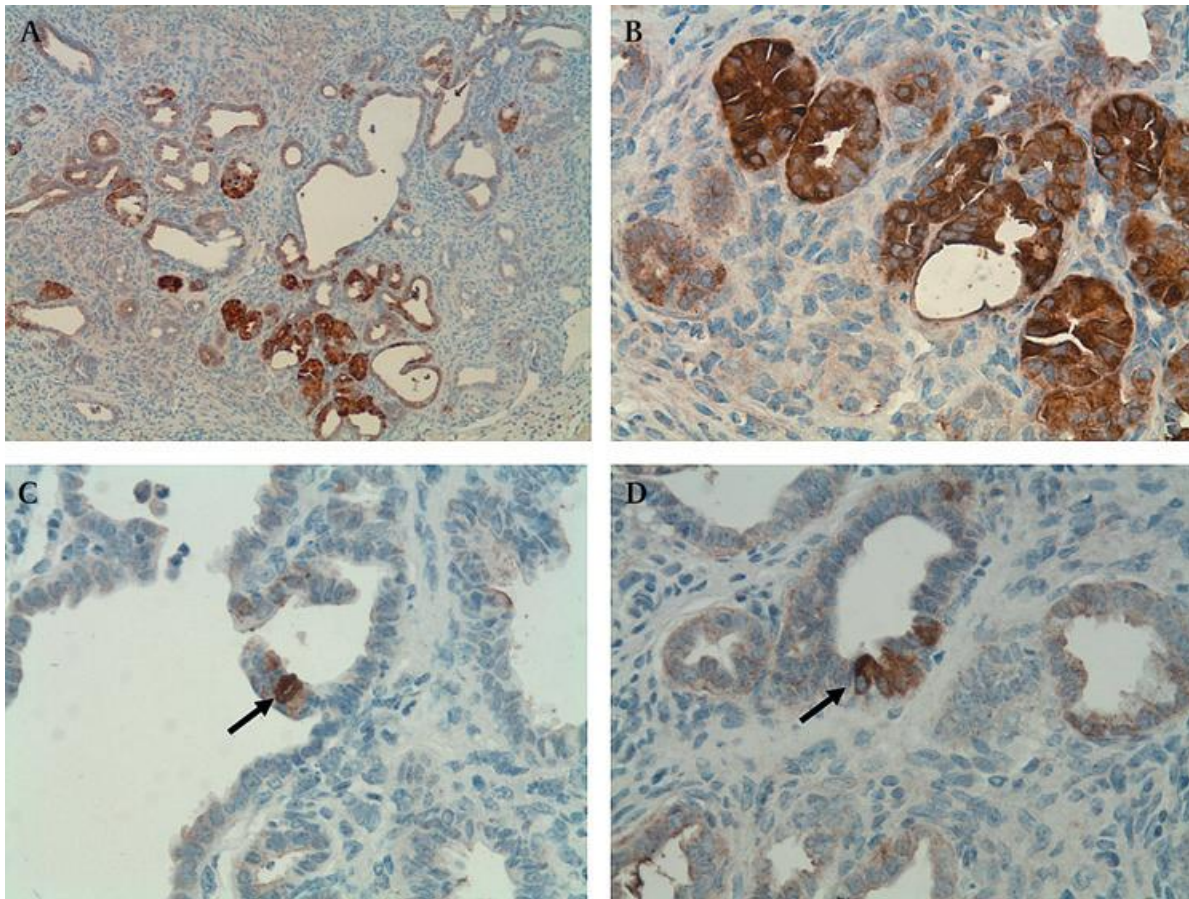


Abb. 27 Überexpression der Amylase in PanINs und Pankreaskarzinom der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse (A,B), Überexpression der Amylase an Azinuszellen (C,D), Amylase-positive-Zellen wurde in PanINs präsentiert und bestätigen die phenotypische exokrine Differenzierung.

4. Diskussion

Mehr als 11.000 Menschen sterben in Deutschland jährlich am duktalen Adenokarzinom des Pankreas (1). Ausschließlich 10 bis 20 Prozent der Patienten präsentieren sich bei der Primärdiagnose mit einem resektablen Pankreaskarzinom und nur 1-4% aller Patienten überleben die ersten fünf Jahre. Trotz eines explosionsartigen Wachstums in unserem Verständnis über die Pathologie dieser Erkrankung, hat sich bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit in den letzten 30 Jahren so gut wie nichts verändert. Die Gründe für die schlechte Prognose liegen in der späten Diagnosestellung und der aggressiven Tumorzellbiologie (51). Auch die bisherigen Ergebnisse der adjuvanten Radio- und Chemotherapie sowie die Ergebnisse der intraoperativen Bestrahlung sind enttäuschend. Ein morphologischer Transformationsprozeß wurde in den letzten Jahren beim duktalen Pankreaskarzinom postuliert. Innerhalb der Entwicklung des Pankreaskarzinoms werden Transformationsprozesse duktaler Zellen klassifiziert, die als sog. Pancreatic Intraepithelial Neoplasias (PanINs) bezeichnet werden. Es wäre für Hochrisiko-patienten von großer Bedeutung, wenn man ihnen eine Chemoprävention anbieten könnte. Verschiedene Studien zeigten, dass K-ras-Mutationen früh in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms erfolgen und häufig bei präkanzerösen Veränderungen bereits zu finden sind. Diese Befunde sprechen dafür, dass K-ras-Mutationen ihre Wirkung mehr bei der Initiierung der Kanzerogenese besitzen und p53-Mutationen vor allem für die Progression der Krankheit verantwortlich sein könnten (54). Die Arbeitsgruppe von Hingorani hatte bestätigt, dass alle transgenen Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse (33 von 33) nach 12 bis 15 Monaten unterschiedliche PanIN-Läsionen und auch invasive Pankreaskarzinome entwickeln, die den humanen Vorläufern des Pankreaskarzinoms entsprechen (31). Die Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse hatten eine mittlere Überlebenszeit von nur 5 Monaten. Alle Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse (n=28) starben nach 12 Monaten und 96% (27/28) der dreifach mutierten Mäuse entwickelten ein invasives Pankreaskarzinom mit malignem Aszites, Kachexie und Abdominaler Distention als Begleitsymptome. Dies sind die gleichen Begleitsymptome, die auch Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom aufweisen. Die Metastasierung der mutierten Mäuse erfolgte wie beim humanen Pankreaskarzinom in Leber (70%) und Lunge (50-60%), sowie in Nebenniere (20%) und Peritoneum (20-30%) (31). Im Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre Mausmodell bietet sich die Möglichkeit, die Karzinogenese

des Pankreaskarzinoms zu untersuchen, die das Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms des Menschen widerspiegelt.

In einer retrospektiven Kohortenstudie zeigte sich, dass 5207 Patienten in der Behandlungsgruppe mit ACE-Hemmern oder anderen Blutdruck senkenden Medikamenten für 10 Jahre eine niedrigere Inzidenz hatten, ein humanes Karzinom zu bekommen (45). Eine andere Studie die bei 483733 US Veteranen durchgeführt wurde, zeigte in der Behandlungsgruppe mit ACE-Hemmern eine niedrigere Inzidenz für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (OR 0.48, $P < 0.01$) (77). Arafat et al hatte nachgewiesen, dass ein Zusammenhang zwischen Angiotensin II und AT1-Rezeptor und VEGF besteht und Angiotensin II die mRNA-Expression von VEGF in endothelialen Zellen und im duktalem Adenokarzinom des Pankreas induziert (6, Abb 8). Vaskulär endothelial Wachstumsfaktor (VEGF) ist eine entscheidende Komponente der Angiogenese beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Die schlechte Prognose ist abhängig von Lymphknoten- Metastasen (15, 36, 37, 64). Arafat et al hatte auch nachgewiesen, dass der ACE-Hemmer Captopril mit einer Konzentration von 10 μM , oder der AT1-Rezeptor-Hemmer Losartan mit einer Konzentration von 100 μM mRNA den VEGF und die Proteinkonzentration in der Zellkultur des duktalem Pankreaskarzinoms reduziert ($p < 0.05$) (6). Das Zellwachstum des duktalem Pankreaskarzinoms wurde auch durch die Hemmung des endogenen Angiotensin II durch Captopril ($p < 0.02$) oder Losartan ($p < 0.05$) reduziert (6). Yasumaru et al hatte eine protektive Funktion der Kombinationstherapie mit ACE-Hemmer und COX-2-Hemmer für das Kolonkarzinom bestätigt. Durch die Therapie wurde das Wachstum des Tumors signifikant reduziert. Außerdem wurde die Expression von IGF-I Rezeptoren reduziert, die das Tumorwachstum und die Invasion induzieren (78). Hier wurde nun zum ersten Mal die Wirkung des ACE-Hemmer Enalapril zur Chemoprävention gegen das Pankreaskarzinom im transgenen Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}- und Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mausmodell untersucht. Dieses Mausmodell spiegelt das Tumorprogressionsmodell des menschlichen Pankreaskarzinoms wieder.

Bei bis zu 60% der Patienten mit Pankreaskarzinom wurden eine verstärkte Aktivierung des Akt und PI3K/Akt-Signalweges und eine signifikante Korrelation von Akt-Aktivierung und schlecht differenzierten Pankreaskarzinomen festgestellt (3, 17, 58, 60). Zudem fördert Akt das Überleben und die Proliferation von Zellen, indem es NF- κ B und mTOR aktiviert. Die Überexpression der Gene für NF- κ B wurde in Pankreaskarzinomzellen bestätigt (7-8). NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle in

der Aktivierung antiapoptotischer und inflammatorischer Signalwege und reguliert die Regression vieler Gene, die beim Zellwachstum, der Zellproliferation, der Apoptose und der Tumorangio-genese eine wichtige Rolle spielen. Es war auch bekannt, dass ACE-Hemmer ein Inhibitor für NF- κ B ist (29).

In der Kontrollgruppe entwickelte sich bei 75% der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen (15 von 20) ein invasives Pankreaskarzinom (Abb. 24A). Im Vergleich dazu wurde in der Behandlungsgruppe mit Enalapril ein invasives Pankreaskarzinom bei 23.5% der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen (4 von 17, $p=0.03$) festgestellt (Abb. 25). Sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe wurden keinerlei Metastasen festgestellt. Bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen bestätigen unsere Ergebnisse, dass die Progression von PanINs zum invasiven Pankreaskarzinom durch Chemoprävention mit Enalapril verlangsamt oder teilweise gestoppt wird. Leider wurde keine Langzeitbehandlung durchgeführt, um eine Überlebenskurve im Vergleich zur Kontrollgruppe, zB Kaplan-Meier zu präsentieren oder eine langzeitige Chemoprävention gegen das Pankreaskarzinom zu bestätigen.

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass in der Behandlungsgruppe mit Enalapril nach 3 und 5 Monaten die Progression der PanINs in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen signifikant verzögert wird ($p<0.05$) (Abb. 23). In der Kontrollgruppe waren nach 3 Monaten 53% der Pankreasgänge unverändert, 28.6% wurden als PanIN Ia klassifiziert, zu 16% PanIN Ib, zu 0.6% PanIN II, und zu 0.6% als PanIN III- Läsionen. In der Behandlungsgruppe mit Enalapril waren nach 3 Monaten 73.9% der Pankreasgänge unverändert ($p=0.046$), 14.9% wurden als PanIN Ia Läsionen klassifiziert ($p=0.01$), 10.5% PanIN Ib ($p=0.74$), zu 0.5% PanIN II ($p>0.05$), und überhaupt keine PanIN III- Läsionen. Nach 5 Monaten waren in der Kontrollgruppe zu 58% normale Pankreasgänge, zu 28% PanIN Ia, zu 17.6% PanIN Ib, zu 0.4% PanIN II und keine PanIN III- Läsionen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in der Behandlungsgruppe mit Enalapril zu 58% normales Pankreasgänge ($p=0.001$), zu 15.2% PanIN Ia ($p=0.001$), zu 10.5% PanIN Ib ($p=0.03$), und keine höhergradigen PanINs nachgewiesen. Diese Zahlen bestätigen eine erfolgreiche Chemoprävention in der Behandlungsgruppe. Sie hat zu einer signifikanten Reduktion der PanIN-Grade im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt.

Zusätzlich wurden eine Überexpression von AT1-Rezeptor und NF- κ B im Tumorgewebe der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen und LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre-Mäusen nachgewiesen (Abb.21-22). Zur Überprüfung der

pharmakologischen Wirkung des ACE-Hemmer Enalapril wurde die mRNA des Tumorgewebes extrahiert und untersucht. Beim Pankreaskarzinom erfolgte eine Überexpression von VEGF und Angiotensin II, die die mRNA-Expression von VEGF in endothelialen Zellen und im duktalem Adenokarzinom des Pankreas induzieren (6). Es ist auch bekannt, dass Enalapril den VEGF und NF- κ B herunter regulieren kann (6). Der Transkriptionsfaktor p65 ist ein Protein, das beim Menschen durch das RelA-Gen codiert ist. Die p50 (NFKB1) / p65 Heterodimer (RelA) ist die häufigste Komplexform der NF- κ B. Durch die Untersuchung von RelA wurde festgestellt, wie stark Enalapril die NF- κ B runter reguliert. Mit der real time PCR wurden die beiden Gene des Pankreaskarzinoms von Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen in der Behandlungsgruppe mit Enalapril reguliert (Abb. 26). Unsere Ergebnisse zeigten, dass mVEGF ($p < 0.05$) und mRelA ($p < 0.05$) durch Enalapril im invasiven Pankreaskarzinom signifikant runter reguliert wurden (Abb. 26). Unsere Ergebnisse bestätigten die Auswirkungen von Enalapril, dass die Progression und die Entstehung des Pankreaskarzinoms hemmt.

Nach Sakamoto et al. wurde die Enalapril-Dosierung mit 0.6mg/kg/täglich in den Behandlungsgruppen festgelegt. Enalapril wurde 1mal pro Tag intraperitoneal injiziert. Bei den prototypischen 70 kg schweren Erwachsenen würde die Behandlung mit 42 mg pro Tag durchgeführt werden. Enalapril wurde zur Blutdrucksenkung zugelassen. Bei Bluthochdruck beginnen Erwachsene die Behandlung mit einer Anfangsdosis von fünf bis höchstens 20 Milligramm Enalapril einmal täglich. Bei der auf die Anfangsphase folgenden Dauerbehandlung des Bluthochdrucks liegt die so genannte Erhaltungsdosis bei 20 bis höchstens 40 Milligramm Enalapril pro Tag. Natürlich sind die effektiven Konzentrationen des Medikamentes von unterschiedlichen Verabreichungsformen abhängig, zum Beispiel oral oder intraperitoneal. Leider wurden die Blutkonzentrationen des Medikamentes bei den Mäusen in unseren Behandlungsgruppen nicht untersucht. Sonst könnte man eine aussagekräftigere effektive Dosierung am besten im Vergleich zur effektiven Dosierung bei Menschen präsentieren.

Das Medikament Enalapril wird seit langem von Patienten genommen und die Nebenwirkungen sind auch bekannt. Häufige Nebenwirkungen sind Schwindel, Schwächegefühl, Sehstörungen (selten mit Bewusstseinsverlust ohne erkennbare Ursache), Nierenfunktionsstörungen (selten bis zum Nierenversagen), trockener Reizhusten, Bronchitis, Übelkeit, Oberbauchbeschwerden, Verdauungsstörungen, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schläfrigkeit, Verminderung der

Konzentration des roten Blutfarbstoffs. Bei unserem Mausmodell ist es leider nicht machbar, die häufigen Nebenwirkungen des Medikamentes zu überprüfen. Pathologisch sollte eine organische Nebenwirkung ausgeschlossen werden.

Zum ersten Mal wurde das Medikament zur Chemoprävention gegen das Pankreaskarzinom im transgenen Mausmodell eingesetzt, um die Auswirkungen zu untersuchen. Das Mausmodell bietet eine wichtige Quelle zum Einblick in Bezug auf menschliche Neoplasien. Es sollte noch überprüft werden, ob der pharmakologische Effekt dosisabhängig ist und ob Langzeitbehandlungsgruppen einen besseren Survivaleffekt im Vergleich zur Kontrolle zeigen.

Anschließend sind weitere Studien erforderlich, um die Hypothese zu bestätigen, dass ACE-Hemmer zur Chemoprävention für Patienten mit einem erhöhten Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln tatsächlich von Nutzen sind.

5. Literaturverzeichnis

1. Albores-Saavedra J, Vuitch J, Henson DE: Exocrine pancreas. In: Henson DE, Albores-Saavedra J (eds): Pathology of incipient neoplasia. Ed. Philadelphia: W B Saunders Co, 1993; 182-190.
2. Almoguera et al. 1988, Hruban et al. 1993
3. Altomare D A, Tanno S, De Rienzo A, et al. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. J Cell Biochem 2003; 88:470–6.
4. Anderson WF, Umar A, Viner JL, Hawk ET. The role of cyclooxygenase inhibitors in cancer prevention. Curr Pharm Des 2002; 8: 1035-1062
5. Apple SK, Hecht JR, Lewin DN et al. (1999) Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. Hum Pathol 30:123
6. Arafat HA, Gong Q, Chipitsyna G, et al. Antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers in pancreatic ductal adenocarcinoma. J Am Coll Surg 2007; 204:996e1005.
7. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. J Clin Invest 1997; 101: 40-50.
8. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. Oncogene 2004; 23:8571-8580
9. Asano T, Yao Y, Zhu J, et al. The rapamycin analog CCI-779 is a potent inhibitor of pancreatic cancer cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2005; 331:295–302.
10. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J et al. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat Cell Biol 2: 84–89.
11. Bergers, G. and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat. Rev. Cancer 3, 401-410.
12. Berk B, Corson M. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle. Role of tyrosine kinases. Circ Res 1997; 80: 607-16.
13. Boring CC, Squires TS, Tong T: Cancer statistics, 1994. CA Cancer J Clin 1994; 44: 7-26.
14. Boschman CR, Stryker S, Reddy JK, Rao MS (1994) Expression of p53 protein in precursor lesions and adenocarcinoma of human pancreas. Am J Pathol 145:1291
15. Buchler P, Reber HA, Buchler MW, et al. VEGF-RII influences the prognosis of pancreatic cancer. Ann Surg 2002; 236:738–749.
16. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG et al. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol 2: 76–83.
17. Cheng J Q, Ruggeri B, Klein W M, et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:3636–41.R.
18. Deutsches Ärzteblatt 94, Heft 49, 5. Dezember 1997

19. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-1188
20. Elizabeth Escobar¹, Tatiana Sofía Rodríguez-Reyna², Oscar Arrieta^{1,2,*} and Julio Sotelo¹, Arafat et al Angiotensin II Blockade in Pancreatic Cancer, Vol. 204, No. 5, May 2007
21. Ermert L, Dierkes C, Ermert M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1604-1610
22. Friess H, Kleef J, Fischer L, Mueller M, Büchler MW. Chirurgische Standardtherapie beim Pankreaskarzinom. *Chirurg* 2003; 74:183-190
23. Friess H, Yamanaka Y, Kobrin M S, et al. Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. *Clin Cancer Res* 1995;1:1413–20.
24. Fujita N, Jaye DL, Kajita M, Geigerman C, Moreno CS, Wade PA. (2003). MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* 113: 207–219.
25. Grewe M, Gansauge F, Schmid R M, et al. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:3581–7.
26. Griffin SA, Brown WC, McPherson et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991; 17: 626-3
27. Habbe N, Shi G, Meguid RA, et al. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18913-8.
28. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Dec;4(12):988-1004.
29. Hernández-Presa MA, Bustos C, Ortego M, et al. ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1998;153:1825-37.
30. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA: Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003, 4:437-450
31. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson D. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005; 7: 469-483
32. Horiuchi M, Akishiita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999; 33: 613-21.
33. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 and induces apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 19022-26.
34. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, Offerhaus GJ: Pancreatic intraepithelial

- neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:579-586
35. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, Furth EE, Furukawa T, Klein A, Klimstra DS, Kloppel G, Lauwers GY, Longnecker DS, Luttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Perez-Gallego L, Redston M, Tuveson DA. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res* 2006; 66:95-106
 36. Itakura J, Ishiwata T, Shen B, et al. Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2000;85:27–34.
 37. Itakura J, Ishiwata T, Friess H, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1309–1316.
 38. Ito D, Fujimoto K, Mori T, et al. In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2006;118:2337–43.
 39. Karreth F, Tuveson DA. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1058-9.
 40. Khurana V, Caldito G, Barkin JS. Angiotensin converting enzyme inhibitors decrease the incidence of pancreatic cancer: a study of half a million US veterans. *Eur J Cancer* 2008;1:S47e48.
 41. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956e9.
 42. Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* 1992;90:1352–60.
 43. Kristin E. Anderson, Trista W. Johnson, DeAnn Lazovich, Aaron R. Folsom Association Between Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use and the Incidence of Pancreatic Cancer National Cancer Institute, Vol. 94, No. 15, August 7, 2002
 44. Laragh JH, Angers M, Kelly WG, Lieberman S. Hypotensive agents and pressor substances: the effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II, and others on the secretory rate of aldosterone in man. *JAMA* 1960; 174:234-40.
 45. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, et al. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998;352:179e84.
 46. Löhr M, Müller P, Mora J, Brinkmann B, Ostwald C, Farre A, Lluís F, Adam U, Stubbe J, Plath F, Nizze H, Hopt UT, Barten M, Capella G, Lieber S (2001a) p53 and K_{ras} mutations in pancreatic juice samples from patients with chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 53 (7): 734_743
 47. Mahmoud NN, Dannenberg AJ, Mestre J, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, Newmark H, Bertagnoli MM. Aspirin prevents tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Surgery* 1998; 124:225-231
 48. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH: Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 2003; 16:902-910

49. Marshall J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer* 2006;107:1207–18
50. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric Oxide Synthase Modulates Angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 2567-78.
51. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H et al.: A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1200–1210.
52. Ohki,R., Nemoto,J., Murasawa,H., Oda,E., Inazawa,J., Tanaka,N., and Taniguchi,T. (2000).Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J.Biol. Chem.* 275, 22627-22630.
53. Paula Ghaneh, Eithne Costello, John P Neoptolemos Biology and management of pancreatic cancer *Gut* 2007;56:1134-1152
54. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN: K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 1994;54:1556-1560.
55. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278: 21113–21123.
56. Repasky, G.A., Chenette, E.J. and Der, C.J. (2004) Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol*, 14, 639-647.
57. Rouet-Benzineb P, Gontero M, Dreyfus P, Lafuma C. Angiotensin II Induces Nuclear Factor-kB Activation in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes Through Protein Kinase C Signaling Pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1767-78.
58. Ruggeri B A, Huang L, Wood M, et al. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog* 1998; 21:81–6.
59. Ryan D P, O’Neil B H, Supko J G, et al. A phase I study of bortezomib plus irinotecan in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 2006;107:2688–97.
60. Schlieman M G, Fahy B N, Ramsamooj R, et al. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 2003;89:2110–5.
61. Schmelzle T, Hall M N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:253–62.
62. Schneider G, Lersch C, Schmid RM. Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. *Chirurg* 2003; 74:165-170
63. Sclabas GM, Uwagawa T, Schmidt C, Hess KR, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Nuclear factor kappa B activation is a potential target for preventing pancreatic carcinoma by aspirin. *Cancer* 2005; 12:2485-2490
64. Seo Y, Baba H, Fukuda T, et al. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000;88:2239–2245.
65. Shah S A, Potter M W, Ricciardi R, et al. FRAP-p70s6K signaling is required for pancreatic cancer cell proliferation. *J Surg Res* 2001;97:123–30.

66. Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murray FE. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer *Jama* 1999; 282: 1254-1257
67. Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells *J Biol Chem* 2001; 276: 18075-18081
68. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 651-7.
69. Stroth U, Blume A, Mielke K, Unger T. Angiotensin AT2 receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. *Mol Brain Res* 2000; 78: 175-80.
70. Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI. Angiotensin II Angiogenic Effect in Vivo Involves Vascular Endothelial Growth Factor- and Inflammation- Related Pathways. *Lab Invest* 2002; 82:747-56.
71. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 252-266
72. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 1001-15
73. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998 May 29;93(5):705-16
74. Van Bilsen M. Signal transduction revisited: recent developments in angiotensin II signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1997; 36: 310-22.
75. Vervenne W, et al. A randomized, double-blind, placebo (P) controlled, multicenter phase III trial to evaluate the efficacy and safety of adding bevacizumab (B) to erlotinib (E) and gemcitabine (G) in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol* 2008;26:4507-4509.
76. Volker Fendrich, Nai-Ming Chen, Meike Neef, et al. *Gut* 2010 59: 630-637
77. Yamanaka Y, Friess H, Kobrin M S, et al. Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol* 1993;24:1127-34.
78. Yasumaru M, Tsuji S, Tsujii M, et al. Inhibition of angiotensin II activity enhanced the antitumor effect of cyclooxygenase-2 inhibitors via insulin-like growth factor I receptor pathway. *Cancer Res* 2003;63:6726e34
79. Young Koh G, Kim I, Jin KH, Yun MJ, Chan LJ. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. *Exp Mol Med* 2002; 34:1-11.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACE	angiotensin-I-converting enzyme
ACTH	adrenocortikotropem Hormon
Bad	Bcl2-Antagonist causing cell death
bFGF	Basische Fibroblasten- Wachstumsfaktor
CDK	Cyclin- abhängigen Kinasen
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAG	Diacylglycerol
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
ET-1	Endothelin-1
GAP	GTPase-aktivierenden Proteine
GEF	guanine nucleotide exchange factor
IGF	Insulin-like growth factor-Rezeptor
INK4	inhibitor of CDK4
LSL	Lox-Stop-Lox
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
GC	Guanylcyclase ()
LH	Luteinisierendes Hormon
MEK	Mitogen-activated protein kinase
MKP-1	Protein-Kinase-Phosphatase 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
PanIn	Pancreatic Intraepithelial Neoplasias
PDA	pankreatischen duktalem Epithelzellen
PDGF	Thrombozyten-Wachstumsfaktor
PDK1	Phosphoinositol-dependent-Kinase 1
PI3K	Phosphoinositol-3-OH-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
STAT	Signal Transduction And transcription
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TGF- β	transforming growth factor β
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor

7. Anhang

7.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren:

Alter, Aumüller, Basler, Barth, Bauer, Baum, Boudriot, Christiansen, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Görg, Gress, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Hasilik, Herrmann-Lingen, Hertl, Hofmann, Kann, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Martin, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Renz, Richter, Riße, Roeper, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schofer, Schrader, Seitz, Steiniger, Strempel, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Abteilung für Visceral- Thorax- und Gefäßchirurgie des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Volker Fendrich, danke ich sehr für die Möglichkeit, mich dadurch mit einem interessanten Forschungsthema beschäftigen zu dürfen und für die sehr gute Betreuung sowie für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Besonders erwähnenswert ist seine unermüdliche Geduld.

Allen Mitarbeitern des VTG-Labors möchte ich herzlich für ihre freundliche Hilfe und eine warme Arbeitsatmosphäre danken. Ohne ihren Beistand wäre die Durchführung des Projektes nicht realisierbar gewesen.

Bei Frau Meike Neef und Herrn Johannes Rehm möchte ich mich herzlich bedanken, da sie in vielfältiger Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Eltern danken, denn ohne ihre liebevolle und bedingungslose Unterstützung bei allem, was ich mir vorgenommen habe, wäre ich nie so weit gekommen.